

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉPANCHEMENTS PLEURAUX CHEZ LE COBAYE A LA SUITE DE L'INOCULATION MÉDIASTINALE DE BACILLES TUBERCULEUX

par F. VAN DEINSE.

(Institut Pasteur,
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

INTRODUCTION.

Les expériences qui font l'objet de ce Mémoire nous ont été suggérées par l'observation suivante, faite au cours de nos recherches concernant le pouvoir pathogène des cultures de bacilles tuberculeux ayant subi des passages nombreux sur pomme de terre biliée (1).

Un cobaye est inoculé par voie cardiaque avec 1 mg. de la culture humaine « Gué », cent vingt-cinquième passage sur bile, et meurt un mois plus tard. A l'autopsie, nous sommes surpris de trouver un abondant épanchement légèrement trouble dans la cavité pleurale, les poumons collabés, et un petit abcès caséeux dans le médiastin, derrière la trachée. De toute évidence, notre aiguille avait pénétré dans le médiastin, et l'injection cardiaque avait été manquée.

Cette observation fortuite fut le point de départ d'une série d'expériences, visant à établir la fréquence et la nature des épanchements pleuraux, consécutifs aux inoculations médiastinales de bacilles tuberculeux chez le cobaye.

Plusieurs auteurs se sont déjà occupés des pleurésies expéri-

(1) Voir ces *Annales*, 1941, 66, 191 et 1942, 68, 271.

mentales. Le premier fut Péron (1896), qui réussit à reproduire la pleurésie séro-fibrineuse chez le chien par inoculation directe dans la plèvre de cet animal d'une culture de bacilles de Koch. Il échoua dans ses tentatives chez le cobaye (2). Widal et Ravaut écrivaient en 1900 : « Lorsqu'on détermine chez le cobaye une tuberculose généralisée par inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale, on trouve parfois à l'autopsie un épanchement pleural séro-fibrineux abondant » (3). Il s'agit là, dans la pensée des auteurs, d'une complication fortuite de la tuberculose expérimentale banale du cobaye. R. C. Paterson avait vu (4) que des lapins, auxquels des bacilles tuberculeux virulents avaient été inoculés par voie intrapleurale, répondaient à une nouvelle injection intrapleurale, pratiquée quelques semaines plus tard, par la production rapide d'un exsudat pleural séro-sanguinolent riche en leucocytes. Il s'inspira de cette observation pour injecter par voie intrapleurale des bacilles de Koch virulents chez des cobayes, préalablement « vaccinés » avec des bacilles de Koch peu virulents, et rendus ainsi allergiques, et il vit que ces animaux produisaient des épanchements pleuraux, absents ou beaucoup moins importants chez les témoins non « vaccinés ». Ces expériences furent reprises par H. J. Corper et O. B. Rensch (5) pour le lapin seulement : ils ne purent confirmer les résultats de Paterson. Mais leur technique n'était pas identique : car alors que Paterson sensibilisait ses lapins par une première injection intrapleurale, eux pratiquaient des injections sous-cutanées ou intraveineuses de bacilles humains pour allergiser leurs lapins. Et ils n'ont pas, semble-t-il, expérimenté sur le cobaye. Il se peut pourtant que le cobaye soit plus approprié à ce genre d'expériences que le lapin. Quoi qu'il en soit, une note de L. G. Montgomery et W. S. Lemon semble confirmer l'opinion de Paterson en ce qui concerne le rôle de l'allergie dans l'apparition de certains épanchements pleuraux tuberculeux expérimentaux (6). D'après eux, l'inoculation intrapleurale de bacilles de Koch chez le lapin est suivie de la formation d'une trace de liquide, qui disparaît vers le troisième jour, mais à partir du dixième ou douzième jour, les tissus deviennent allergiques, et il se produit un exsudat beaucoup plus abondant et durable à la suite de la mise en contact de la plèvre sensibilisée avec des bacilles de Koch de réinfection endogène.

A. Boquet et R. Laporte ont repris en 1935 l'étude de l'inocu-

(2) PÉRON, Recherches anatomiques et expérimentales sur les tuberculoses de la plèvre. *Thèse de Paris*, 1896.

(3) *C. R. Soc. Biol.*, 1900, 1118.

(4) *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1917-1918, **4**, 353.

(5) *Amer. Rev. of Tuberc.*, 1920-1921, **4**, 756 et 1921-1922, **5**, 49.

(6) *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic*, 1934, **9**, 137.

lation unique virulente, directement dans la plèvre, chez le cobaye, le lapin et le singe, et n'ont pas trouvé de liquide exsudé à la suite de ces injections, sauf dans la dernière phase de la maladie, quand la séreuse livre passage à un exsudat hémorragique (7). Dans des expériences de surinfection pleurale, ces auteurs constatent que, chez le cobaye et le lapin tuberculeux, la formation de l'épanchement s'effectue après un délai aussi long et d'une manière aussi constante que chez les animaux témoins (8). Ces mêmes auteurs publièrent en 1936 le résultat de recherches entreprises pour élucider le mécanisme par lequel une inoculation intrapéritonéale de bacilles de Koch peut provoquer, chez le cobaye, l'installation précoce d'un processus exsudatif de la plèvre (9). Ils ont vu que ce sont surtout les fortes doses (1 à 5 mg.) de bacilles tuberculeux bovins de type « dysgonique » qui, injectées dans le péritoine du cobaye, en suspension dans 1 c. c. d'eau physiologique, font apparaître ces épanchements pleuraux expérimentaux, dont le caractère rappelle celui des épanchements pleuraux séro-fibrineux de l'homme. Ces réactions pleurales n'ont pas de rapport avec un état allergique éventuel de l'animal, et les auteurs les attribuent à l'influence d'une substance antigénique particulière, présente surtout dans les corps bacillaires des cultures bovines « dysgoniques », libérée à distance dans les foyers péritonéaux et épiploïques, et fixée par la plèvre.

Si donc Montgomery et Lemon semblent vouloir se ranger du côté de Paterson, pour reconnaître à l'état d'allergie des tissus une influence sur l'apparition d'un exsudat pleural expérimental, A. Boquet et R. Laporte pensent, comme Corper et Rensch, que l'allergie ne joue pas un rôle très évident dans ce phénomène. L'auteur japonais Eizo Wakamyia est du même avis (10). C'est le seul expérimentateur, à notre connaissance, qui se soit servi de la voie médiastinale pour provoquer, chez le cobaye, la formation d'exsudats pleuraux. Cette voie d'inoculation a donné, entre ses mains, des épanchements plus abondants que l'injection de bacilles de Koch directement dans la plèvre, et le liquide pleural était présent de façon beaucoup plus constante chez les cobayes neufs que chez les animaux rendus allergiques par une inoculation préalable de bacilles humains morts ou de BCG.

Il est intéressant de noter, sous ce rapport, que F. Fleischner avait déjà remarqué en 1925 la coïncidence fréquente d'une pleurite médiastino-interlobaire chez des enfants atteints de tuberculose des glandes médiastinales (11). Il allait même jusqu'à dire

(7) *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 741.

(8) *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1267.

(9) *C. R. Acad. Sc.*, 1936, **202**, 1718.

(10) *Beitr. z. Klin. d. Tuberk.*, 1937, **90**, 575.

(11) *Klin. Wochenschr.*, 1925, **4**, 875.

qu'un épanchement médiastino-interlobaire cachait très souvent derrière son ombre une adénopathie médiastinale de primo-infection tuberculeuse.

Citons enfin, pour mémoire, que A. Saenz a reproduit les expériences de A. Boquet et R. Laporte en injectant dans le péritoine du cobaye non des bacilles vivants, mais des bacilles de Koch morts, enrobés dans de l'huile de vaseline (12).

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

Nos propres expériences ont porté sur 58 cobayes. Pour pratiquer l'injection médiastinale, l'animal est couché sur le ventre et attaché dans cette position ; après épilation et stérilisation de la peau à l'alcool, l'aiguille est introduite entre la pointe de l'omoplate gauche et la colonne vertébrale, à environ 1 cm. de profondeur. Après s'être assuré qu'on ne peut aspirer ni air, ni liquide, ni sang, on injecte lentement la dose choisie de bacilles en suspension dans 1 c. c. d'eau physiologique et on retire l'aiguille. Il faut éviter d'introduire l'aiguille trop près de la colonne vertébrale, car on risque ainsi de léser un ou plusieurs nerfs moteurs et de voir l'animal plus ou moins paralysé après l'opération, paralysie qui ne tarde d'ailleurs pas à guérir. Plus graves sont les états de choc que peut provoquer l'injection médiastinale, et que l'on ne peut pas toujours éviter, même en opérant le plus prudemment possible. Ces chocs peuvent être mortels, mais ils sont rares heureusement.

Nos 58 cobayes furent inoculés, d'après cette technique, avec des doses différentes des souches suivantes :

- Bovine « Taureau » dysgonique vivante ;
- Bovine « XIV » dysgonique vivante ;
- Bovine G-7 dysgonique vivante (Laporte) ;
- Bovine « Taureau » morte ;
- Bovine « XIII » biliée (cent, cent unième et cent deuxième passage) ;
- Bovine « XIV » biliée (cent deuxième, cent quatrième et cent septième passage) ;
- Humaine « Gué » (peu virulente) ;
- Humaine « 432 » très virulente (Nègre) ;
- Humaine « Gué » biliée (cent vingt-sixième et cent trente-troisième passage) ;
- Aviaire « T XIV » ;
- BCG ;
- « Eau-de-Seine » (paratuberculeux).

Ces injections furent ainsi réparties :

16 cobayes furent inoculés par voie médiastinale avec 1 à 2 mg. de

bacilles bovins dysgoniques vivants, dont 15 ont eu un épanchement pleural.

3 reçurent par la même voie 0,01 mg. de bacilles bovins dysgoniques vivants : les 3 eurent un épanchement.

4 ont eu 2 à 3 injections de bacilles bovins morts (2 mg.) ; tous les 4 ont eu du liquide dans la plèvre.

12 furent injectés avec des bacilles bovins biliés (2 mg.), dont 6 eurent du liquide pleural.

2, inoculés avec la culture humaine peu virulente (2 mg.), sont restés négatifs.

4 furent infectés avec la souche humaine très virulente (2 mg.), dont 3 firent de l'épanchement pleural.

3 ont eu des bacilles humains très virulents à faible dose (0,01 mg.) ; tous les 3 ont eu du liquide dans la plèvre.

4 eurent une injection de bacilles humains biliés (1 mg.) et 2 parmi eux eurent de l'épanchement.

4 reçurent des bacilles aviaires (1 à 2 mg.) : 1 seul fit du liquide.

2 ont reçu des bacilles aviaires à petite dose (0,01 mg.) : aucun d'eux n'a fait de l'épanchement.

2 cobayes injectés avec 2 mg. de BCG sont restés négatifs.

2, inoculés avec des bacilles paratuberculeux, sont également restés négatifs.

Ainsi, sur les 58 cobayes, infectés par voie médiastinale, 37 ont eu de l'épanchement pleural. La plus forte proportion de cas positifs se trouve parmi les cobayes inoculés avec des bacilles bovins « dysgoniques » très virulents ; puis viennent les animaux infectés avec des bacilles humains très virulents. Les bacilles bovins biliés ont déjà donné beaucoup moins de résultats positifs, et les aviaires encore moins. La culture humaine virulente appartenait au type « eugonique » rugueux courant. Il semble que la production d'un épanchement pleural dans ces expériences soit moins une affaire de type « dysgonique » ou « eugonique » que de virulence, pour autant qu'on puisse tirer ces conclusions d'un nombre encore trop restreint d'inoculations.

La voie médiastinale d'inoculation est une des plus sévères, et ses effets ressemblent à ceux d'une injection intraveineuse. Nos cobayes, injectés par la voie médiastinale avec 1 à 2 mg. de bacilles tuberculeux bovins ou humains très virulents, sont morts après une survie moyenne de quatorze à quinze jours (limites extrêmes sept et vingt-cinq jours) pour le bacille bovin, et de vingt-cinq jours (limites vingt et trente-six jours) pour le bacille humain. C'est une différence analogue à celle que nous avons trouvée avec R. Schwartz pour les bacilles bovins et humains inoculés par voie veineuse chez le cobaye (13). Par ailleurs, l'évolution clinique et les lésions trouvées à l'autopsie sont sensiblement les mêmes

pour les deux espèces bacillaires ; nous les décrirons donc ensemble.

L'épanchement pleural peut faire son apparition dès le lendemain de l'inoculation, comme des ponctions répétées nous l'ont montré ; d'autres fois, le liquide n'apparaît que plus tard, par exemple vers le quatrième ou même seulement le dixième jour. Ce liquide, sur lequel nous reviendrons plus loin, peut être d'emblée abondant, ou bien il augmente au cours de la progression de l'infection ; il semble aussi pouvoir se résorber. Il est tantôt louche, incolore, tantôt plus ou moins sanguinolent, jusqu'à ressembler à du sang pur, rarement citrin. Une seule fois nous avons vu un cobaye, appartenant à cette série, succomber d'asphyxie moins de vingt-quatre heures après l'inoculation, ayant environ 20 c. c. de liquide dans la cavité pleurale. Dans l'ensemble la mort des cobayes est due à des causes diverses : elle peut être occasionnée par une simple manipulation, comme par exemple de transporter l'animal de la salle des animaux à la salle d'autopsie, ou il suffit même quelquefois de le tirer de sa cage pour qu'il meure entre les mains. Souvent l'épanchement est cause d'une dyspnée caractéristique, surtout quand il est abondant (10 à 15 c. c.), et la mort semble alors pouvoir survenir par simple asphyxie. D'autres fois l'animal meurt de la généralisation rapide de l'infection, et l'on trouve à l'autopsie un épanchement peu important (2 à 5 c. c.), dont la quantité est insuffisante pour avoir à elle seule pu causer la mort. Les quantités de liquide trouvées à l'autopsie ont été en moyenne de 12 c. c. pour le bacille bovin, et de 8 c. c. pour le bacille humain. Il peut arriver que les ponctions amènent un peu de liquide, par exemple vers le septième jour, qu'on ne retrouve plus à l'autopsie. Il semble donc que de petits épanchements soient susceptibles d'être résorbés, comme nous le disions plus haut. On peut alors trouver quelques adhérences pleurales comme témoins de la réaction pleurale. Mais ce sont là des cas exceptionnels quand il s'agit d'inoculations médiastinales à dose massive. A l'autopsie on trouve l'épanchement toujours réparti sur les deux cavités pleurales, à cause de la communication existant entre les deux chez le cobaye. Exceptionnellement il existe en même temps de l'hydropéricarde et un peu de liquide péritonéal. Les poumons sont plus ou moins refoulés, en rapport avec la quantité de liquide présente. Ils sont congestionnés, ou plus ou moins hépatisés, et portent dans certains cas quelques granulations caséuses. Dans la plupart des cas il ne semble y avoir aucune réaction pleurale proprement dite : il est plutôt rare de trouver des adhérences pleurales, qui, dans un cas, allèrent jusqu'à un compartimentage de la plèvre, et nous n'avons vu qu'une seule fois les poumons couverts de fausses membranes. L'injection médiastinale a laissé sa trace sous forme d'un abcès médiastinal plus ou moins volumineux dans 20 p. 100 des cas.

Les ganglions hilaires et rétro-sternaux sont hypertrophiés et généralement caséeux ; ces derniers peuvent former de véritables chapelets le long des deux côtés de la face interne du sternum. Cette adénopathie peut s'étendre sur tout le système lymphatique. La rate est hypertrophiée dans la moitié des cas, d'autant plus fortement que la survie est plus longue ; elle peut avoir un aspect granuleux, mais on n'y voit pas de lésions nécrotiques. Le foie est congestionné, et on y discerne souvent un réseau de fines taches jaunes anastomosantes, comme J. Bretey et R. Laporte l'ont signalé dans l'infection intraveineuse du cobaye par des bacilles tuberculeux aviaires (14). Les surrénales sont toujours congestionnées et quelquefois considérablement hypertrophiées. Comme on le voit, ces lésions, dues à une généralisation rapide de l'infection, ressemblent à celles qu'on trouve chez le cobaye à la suite d'une inoculation par voie sanguine.

Au point de vue histologique (15) la réaction locale se caractérise par son type exsudatif et son intensité. Dès les premières vingt-quatre heures le tissu péri-œsophagien et péri-trachéal est envahi par les polynucléaires neutrophiles, qui se groupent rapidement en gros foyers et forment parfois de véritables abcès. Les histiocytes locaux réagissent également et on les trouve en général à la périphérie de ces foyers, mêlés aux cellules conjonctives. La réaction ganglionnaire est précoce et aboutit également à la constitution de foyers de polynucléaires, entre lesquels s'intercalent des plages épithélioïdes où les bacilles sont toujours visibles. On n'observe pas, dans ces lésions locales, de formations folliculaires, rarement des cellules géantes, jamais de nécroses caséuses vraies. La généralisation au poumon, au foie et à la rate est précoce et constante. Elle revêt au niveau du poumon le caractère exsudatif banal des lésions médiastinales. Elle est aussi très hémorragique. La réaction pleurale est généralement peu marquée : pas de desquamation ou d'hyperplasie de la couche endothéliale. Toutefois, la zone sous-pleurale du parenchyme pulmonaire est le siège d'une congestion intense. L'envahissement du foie et de la rate se fait sous forme d'îlots réticulo-leucocytaires nombreux d'étendue variable, à point de départ dans les espaces porte et les cordons de Billroth. Les polynucléaires s'observent en grand nombre, mais ils sont accompagnés de cellules épithélioïdes classiques et parfois de cellules géantes, sans organisation folliculaire véritable. Les bacilles sont plus ou moins nombreux. Les reins sont le siège d'une congestion intense et d'une réaction interstitielle endothéliale sans dégénérescence

(14) *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 316.

(15) Voir aussi : J. BABLET et F. VAN DEINSE, Lésions anatomiques et histologiques consécutives à l'inoculation médiastinale de bacilles de Koch, *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 705.

tubulaire ; il y a quelquefois de la dilatation des glomérules. Dans les surrénales, à part une ectasie vasculaire due à la stase sanguine, on peut trouver une infiltration et une dissociation de la médullaire par des foyers leucocytaires, et même de la pycnose des cellules de la médullaire et de la corticale.

L'infection massive à bacilles bovins se distingue de celle à bacilles humains en ce que les premiers paraissent avoir plus particulièrement déclenché l'afflux des polynucléaires neutrophiles et que les bacilles humains ont plutôt provoqué une énorme réaction ganglionnaire à évolution plus lente avec lésions microscopiques se rapprochant davantage du type tuberculeux classique.

Nous ne ferons que résumer brièvement les résultats de nos injections médiastinales de bacilles bovins et humains virulents à faible dose (0,01 mg.). En raison du mode d'inoculation, on observe, ici encore, des généralisations rapides, et tous les cobayes ont présenté des adénopathies tuberculeuses généralisées. On a vu des localisations qu'on n'observe pas habituellement dans l'infection tuberculeuse par voie sous-cutanée : testicule, épidydime, péritoine viscéral, mésentère, etc. Le foie et la rate sont toujours tuberculeux, les poumons couverts de granulations caséeuses, les surrénales congestionnées. La survie a été en moyenne de vingt-huit jours pour le bacille bovin, et de soixante-quatre jours pour l'infection à bacilles humains. Chez les animaux qui ont survécu le plus longtemps, on n'a plus trouvé de liquide pleural à l'autopsie, mais les ponctions répétées au cours de l'évolution de l'infection en avaient révélé l'existence à des dates plus ou moins éloignées de l'inoculation : il semble qu'avec le temps le liquide ait été résorbé malgré la progression de la tuberculose généralisée. La quantité de liquide n'a jamais été assez élevée pour causer des signes cliniques (1 à 2 c. c., une fois 6 c. c.).

Les inoculations médiastinales de bacilles bovins ou humains biliés ont donné des résultats très variés. Un cobaye est mort dans les vingt-quatre heures après l'injection, ayant dans la plèvre une dizaine de centimètres cubes d'épanchement louche. Un autre, mort après quatre-vingt-onze jours, avait encore 8 c. c. de liquide louche dans la plèvre. Trois animaux, chez lesquels un épanchement important avait été diagnostiqué, soit par ponction, soit par une forte dyspnée, ont résorbé leur épanchement et sont morts après trente-cinq, cinquante et cinquante-six jours respectivement, sans liquide pleural. Les lésions trouvées chez les cobayes de cette catégorie sont comparables à celles décrites plus haut pour les animaux infectés avec des bacilles pleinement virulents ; on trouve seulement plus souvent dans le médiastin une masse caséeuse importante comme vestige de l'inoculation. Les survies ont varié entre neuf jours et dix mois, abstraction faite de l'animal mort dans les vingt-quatre heures. Parmi les 16 animaux appartenant à ce groupe, 4 seulement étaient porteurs de lésions tuber-

culeuses typiques ; les autres ne présentaient à l'autopsie que des états congestifs des poumons, plus ou moins refoulés par un épanchement pleural éventuel, de la rate, souvent très tuméfiée, et des surrénales ; quelques-uns avaient le foie couvert de ce réseau de fines taches jaunes anastomosantes, déjà mentionné plus haut.

D'après ce que nous venons d'exposer, l'apparition de l'épanchement au cours de l'infection tuberculeuse consécutive à l'inoculation médiastinale semble pouvoir se produire à des moments variés et indépendants de l'installation de l'état d'allergie. Il y a même eu 2 cas d'épanchements importants, qui se sont produits dans les vingt-quatre heures suivant l'inoculation.

Pour essayer d'élucider au moins une action favorisante éventuelle de l'allergie, nous avons pratiqué des injections de bacilles morts, répétées deux ou trois fois, que nous pouvons résumer ainsi :

Un cobaye, injecté dans le médiastin avec 2 mg. de bacilles bovins morts (dans 1 c. c. d'eau physiologique), est ponctionné trois jours après : on ne trouve pas de liquide. Nouvelle ponction trois semaines après l'inoculation : encore négative. L'animal reçoit une deuxième injection de bacilles bovins morts par la même voie, sept semaines après la première ; sacrifié le surlendemain, il est trouvé porteur d'un épanchement (7 c. c. de liquide très sanguinolent) dans la plèvre.

Un deuxième cobaye, inoculé dans le médiastin avec 2 mg. de bacilles bovins morts, est ponctionné trois jours après et on trouve déjà du liquide. Il reçoit une nouvelle injection de bacilles bovins morts (même dose) dans le médiastin sept semaines après la première, et est sacrifié cinq jours plus tard : on ne trouve plus aucune trace de liquide dans la plèvre.

Le troisième cobaye, inoculé comme les deux premiers, a également donné du liquide à la ponction pleurale, pratiquée trois jours après l'inoculation. Ce liquide persistait, fortement sanguinolent, trois semaines après l'inoculation. L'animal reçut une deuxième injection de bacilles morts sept semaines après la première, et une troisième six semaines après la seconde. Sacrifié le lendemain de cette dernière inoculation, il avait une dizaine de centimètres cubes de liquide hémorragique dans la plèvre. A l'autopsie, on trouva les poumons refoulés et congestionnés dans la partie sous-pleurale et un assez gros abcès dans le médiastin.

Le quatrième cobaye reçut deux injections médiastinales de bacilles morts à un mois d'intervalle. Il ne fut pas ponctionné entre les deux. Le lendemain de la seconde injection, une ponction pleurale amena une trace de liquide sanguinolent. Sept jours après la dernière injection, l'animal est mort entre nos mains, et à l'autopsie nous trouvâmes 15 c. c. de liquide louche légèrement sanguinolent dans la plèvre, ayant complètement refoulé les poumons.

L'ensemble de ces observations ne plaide pas, à notre avis,

pour une action favorisante de l'état d'allergie dans la production de l'épanchement pleural.

Les inoculations de 1 à 2 mg. de bacilles aviaires dans le médiastin ont provoqué, chez 1 seul cobaye sur 4, l'apparition de 20 c. c. d'épanchement trouble dans la plèvre. Exception faite pour les granulations pulmonaires, toujours absentes dans l'infection aviaire, les lésions étaient tout à fait comparables à celles qu'on trouve chez les cobayes inoculés par voie médiastinale avec de fortes doses de bacilles bovins ou humains virulents : poumons congestionnés, foie couvert d'un réseau de fines taches anastomosantes, grosse rate, surrénales hypertrophiées et congestionnées. Histologiquement les lésions se ressemblent également. Les survies ont été de treize (l'épanchement), vingt-sept, vingt-sept et quarante et un jours respectivement.

NATURE DU LIQUIDE.

On a pu voir dans ce qui précède que la réaction pleurale, consécutive à l'inoculation médiastinale, est souvent plus ou moins hémorragique, et le liquide pleural peut même ressembler à du sang pur. Pour étudier la nature de l'épanchement, nous avons écarté ces liquides plus ou moins mêlés de sang (c'est-à-dire à peu près la moitié).

Les liquides incolores, ne contenant pas de globules rouges à l'examen microscopique, donnent une réaction de Rivalta positive. Nous ne croyons pas, cependant, pouvoir les considérer autrement que comme des transsudats. La réaction de Rivalta peut d'ailleurs être positive dans certains épanchements purement mécaniques, et même négative dans d'authentiques pleurésies, comme l'a fait remarquer F. Joly (16). D'autre part, on est frappé par l'absence quasi constante de toute réaction pleurale proprement dite, même dans les cas d'épanchement abondant, comme nous l'avons déjà dit plus haut, alors que le tissu pulmonaire sous-pleural se trouve dans un état de congestion intense. Le temps de coagulation des liquides est d'autant plus court qu'ils sont plus fortement mélangés de sang; toutefois, parmi les liquides incolores il y en a qui restent indéfiniment à l'état liquide, alors que d'autres se coagulent plus ou moins rapidement. L'examen microscopique des frottis de liquide pleural colorés au May-Grünwald-Giemsa révèle une prépondérance marquée des lymphocytes, à côté de quelques polynucléaires et monocytes. La présence de sang modifie évidemment la formule, surtout par l'apport de polynucléaires sanguins. On trouve la prépondérance des lymphocytes dans les liquides précoces autant que dans les épanchements existant déjà depuis quelque temps.

(16) *Paris Médical*, 1935, 95, 423.

En clinique humaine, Le Damany (17), puis Schlossmann (18) ont remarqué que le liquide de pleurite séro-fibrineuse, quand on l'injectait dans le péritoine du cobaye, se montrait toxique pour cet animal. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune toxicité de ce genre dans nos liquides.

Mais ces liquides, quand ils proviennent de cobayes inoculés avec des bacilles de Koch vivants et virulents, sont très virulents pour le cobaye neuf. A l'examen microscopique des frottis de liquide, colorés au Ziehl, on peut mettre en évidence de rares bacilles de Koch dans environ un tiers des cas ; dans les autres, les bacilles de Koch restent introuvables. Dans un seul liquide il y avait des bacilles de Koch assez nombreux, sans que la réaction pleurale y fût plus prononcée qu'ailleurs. L'ensemencement direct sur milieu à l'œuf de Lœwenstein ou à l'œuf-sérum de Laporte, des liquides apparemment sans bacilles a donné des cultures abondantes huit fois sur dix.

Quand on place un liquide, dans lequel l'examen microscopique n'a pas permis de déceler des bacilles de Koch, à l'étuve à 37°, on voit apparaître dans ce liquide des colonies microscopiques de bacilles acido-résistants, après un séjour à l'étuve de quinze jours environ, et ces colonies peuvent même devenir visibles à l'œil nu sous forme de grumeaux au fond du tube. Ces cultures, qui se sont formées dans le liquide tel quel, restent virulentes plusieurs mois.

Certains auteurs ont vu qu'en pathologie humaine les sérosités tuberculeuses de la plèvre ont un pouvoir bactéricide sur le bacille tuberculeux (19). D'après E. Buc, l'exsudat pleural entrave au contraire l'action bactériolytique des tissus tuberculeux vis-à-vis du bacille de Koch (20). Quant à nous, il nous a été impossible, jusqu'ici, de mettre en évidence une action bactéricide des épancements pleuraux de nos cobayes vis-à-vis du bacille tuberculeux.

CONCLUSIONS.

L'inoculation par voie médiastinale, chez le cobaye, de bacilles tuberculeux, a des effets pathologiques comparables à ceux qui suivent l'infection tuberculeuse par voie veineuse chez ce même animal. L'inoculation médiastinale provoque en outre la formation d'un épanchement pleural chez le cobaye, d'autant plus régulièrement que la souche employée est plus virulente. La quantité

(17) Cité par F. BEZANÇON et M.-P. WEIL, *Ann. de Méd.*, 1927, **21**, 331.

(18) *Bull. Union internat. contre la Tuberc.*, juillet 1925, **2**, n° 2, 3.

(19) Par exemple : P. COURMONT, *C. R. Soc. Biol.*, 1898, **5**, 605. — Y. NEDELKOVITCH, *ibid.*, 1928, **99**, 579. — BLAVET DI BRIGA, *Giorn. di Batter. e Immunol.*, 1930, **5**, 518.

(20) *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 727.

de liquide pleural semble en rapport avec la dose de bacilles injectée. L'épanchement peut apparaître abondant dès le lendemain de l'injection médiastinale, ce qui ne plaide pas en faveur d'une influence de l'état d'allergie sur sa formation. A l'autopsie et à l'examen histologique on est frappé par l'insignifiance de la réaction pleurale. L'examen cytologique du liquide montre une lymphocytose prépondérante dès les débuts de l'épanchement. Dans les deux tiers des cas, on ne trouve pas de bacilles dans les frottis des liquides colorés au Ziehl. Ces liquides apparemment abacillaires donnent pourtant, dans les 4/5 des cas, des cultures abondantes quand on les ensemence directement sur milieu à l'œuf, et ils tuberculisent le cobaye neuf. Quand on les place tels quels à l'étuve à 37°, on voit que des colonies de bacilles acido-résistants se développent au fond de ces liquides sous forme de micro-colonies ou de grumeaux visibles à l'œil nu.

**SUR UNE CAUSE IMPORTANTE D'ERREUR
DANS LE TITRAGE D'UN BACTÉRIOPHAGE
CAS DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES
NON HOMOGÈNES (*)**

par PIERRE NICOLLE.

En utilisant, pour des titrages par numération de plages, la technique qui consiste à répandre sur la surface de la gélose d'une boîte de Petri la dilution convenable de bactériophage additionné d'une suspension de la bactérie sensible sans faire usage d'un étaleur (1), nous avons éprouvé, dans le cas du bactériophage streptococcique B. 563, une série de mécomptes. Cependant, M. Wollman, étudiant la thermosensibilité de différents bactériophages streptococciques, avait obtenu, par l'emploi de l'étaleur, des résultats très satisfaisants. Sans nul doute, dans l'exemple envisagé, notre technique était en défaut. Nous nous sommes proposé de chercher un mode opératoire applicable à ce cas particulier, c'est-à-dire donnant le nombre le plus élevé de plages pour une dilution donnée, et la plus grande régularité.

A cette occasion, M. Wollman attira notre attention sur une cause d'erreur liée à l'emploi de suspensions bactériennes non homogènes. Au cours de recherches, restées inédites, sur le bactériophage *subtilis*, M. Wollman avait constaté, en effet, avec des suspensions de cette bactérie contenant des amas ou des grumeaux bactériens, des perturbations importantes dans les résultats fournis par la technique courante de numération des plages. Il nous a autorisé à faire état de ses observations.

Dans la technique habituelle de titrage des bactériophages par numération des plages, des suspensions très faibles de bactériophages (quelques milliers de corpuscules par centimètre cube) sont mises en présence de suspensions très chargées (des centaines ou des milliers de millions par centimètre cube) en bactéries. La probabilité pour qu'une bactérie fixe plus d'un corpuscule bactériophage se trouve donc être pratiquement nulle.

Soigneusement étalé, un tel mélange doit donner théoriquement dans le cas de suspensions bactériennes homogènes, autant de

(*) Communication présentée à la séance du 3 décembre 1942 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) C. R. Soc. Biol., 1941, **135**, 548, 709 et 1098.

plages qu'il contient de corpuscules bactériophages. Dans le cas de suspensions non homogènes, des amas bactériens pourront fixer un nombre plus ou moins élevé de bactériophages, tout en ne donnant qu'une plage par amas. Il en résultera une diminution plus ou moins considérable du nombre des plages. *A priori*, cette diminution pourra être régulière, c'est-à-dire que le nombre de plages sera proportionnel à celui des corpuscules bactériophages, si les amas bactériens de taille à peu près égale sont uniformément répartis dans la suspension. La diminution sera au contraire variable si les amas bactériens sont de taille inégale et se trouvent irrégulièrement répartis dans la suspension. Le nombre des plages fournies par une même quantité de bactériophage pourra, dans ce dernier cas, varier de façon à rendre impossible toute recherche d'ordre quantitatif. On trouvera plus loin des exemples de chacun des deux cas envisagés.

Pour parer aux causes d'erreur introduites par l'emploi de suspensions non homogènes, M. Wollman a eu recours à l'artifice suivant : au lieu d'étaler à la surface de la gélose le mélange bactériophage + suspension bactérienne, l'étalement se fait en deux temps ; la dilution de bactériophage d'abord, puis quinze à vingt minutes plus tard, la suspension bactérienne. Les corpuscules bactériophages, se trouvant ainsi fixés sur la gélose, donneront dorénavant naissance à autant de plages, qu'on ait affaire à des suspensions homogènes ou non.

Les exemples suivants illustrent ce que nous venons de dire. Le premier, tiré d'expériences inédites de E. Wollman, est fourni par le *B. subtilis* qui donne des suspensions à amas très inégaux. Le deuxième porte sur le streptocoque 563 qui faisait l'objet de recherches rappelées au début de cette note et dont ces suspensions sont constituées par des chaînettes isolées ou groupées en très petits amas assez régulièrement répartis.

1° Bactériophage du *B. subtilis* dilué à 2.10^{-4} et éprouvé en présence du germe homologue en étalant le mélange bactériophage + bactéries. On fait 4 boîtes avec chaque échantillon (A, Témoin ; B, chauffé à 55° pendant huit heures) [tableau I].

TABLEAU I.

BOÎTES	NOMBRE DE PLAGES	
	A	B
1	70	125
2	1 000	280
3	140	65
4	40	47
Moyenne	312	129

Les échantillons de bactériophage *subtilis* ci-dessus sont éprouvés quarante-huit heures plus tard en étalant le bactério-

phage d'abord, puis après un intervalle de vingt minutes, environ, la suspension bactérienne (tableau II).

TABLEAU II.

BOITES	NOMBRE DE PLAGES	
	A	B
1	497	481
2	528	382
3	493	334
4	480	303
Moyenne	499	375

2° Bactériophage streptococcique B. 563. Ce bactériophage, nous l'avons dit plus haut, donnait par étalement simultané avec le streptocoque et sans utiliser l'étaleur, des résultats très irréguliers dans le nombre des plages.

Dans une première série d'expériences, nous avons comparé les résultats obtenus, d'une part en mettant sur les boîtes de gélose la dilution convenable du bactériophage et une suspension du streptocoque et en étalant ce mélange au moyen d'un étaleur pendant un temps rigoureusement identique (une minute trente secondes). Les résultats de 4 boîtes faites dans ces conditions ont été : 127-134-130-136 (moyenne : 131) ; et, d'autre part, en opérant en deux temps : d'abord l'étalement de la dilution convenable du bactériophage pendant une minute avec l'étaleur, puis, dix minutes après, la suspension bactérienne également pendant une minute. Les boîtes faites dans ces conditions ont donné : 398-440-396-360 (moyenne : 398).

Dans les deux cas, l'homogénéité des résultats a été satisfaisante puisque les écarts d'une boîte à l'autre, dans la même série, ne sont pas considérables. Mais on remarquera qu'en pratiquant l'étalement en deux temps, on obtient un nombre moyen de plages égal à 303 p. 100 de celui qu'a donné l'étalement en un seul temps.

Dans une seconde série d'expériences, faites un même jour, en partant de la même dilution bactériophagique et de la même suspension bactérienne nous avons partout pratiqué l'étalement en deux temps avec un intervalle de dix minutes. Dans un premier titrage, la dilution de bactériophage était répandue sans étaleur, la suspension bactérienne également. On a obtenu : 280-265-270-272 (moyenne : 271).

Dans un second titrage la dilution de bactériophage était étalée au moyen de l'étaleur pendant une minute, la suspension bactérienne, répandue sans étaleur : les résultats n'ont pas été très différents : 290-292-293-280 (moyenne : 288).

Dans un troisième titrage, nous avons utilisé l'étaleur pour la dilution de bactériophage (une minute) et ensuite pour la suspen-

sion bactérienne (une minute). On a obtenu : 585-550-583-561 (moyenne : 569).

Enfin, dans un dernier titrage, on a répandu la dilution de bactériophage sans étaleur, mais on a utilisé ce dernier pour la suspension bactérienne (une minute). La numération des plages a donné : 462-456-450 (moyenne : 456).

De ces quatre titrages, on peut tirer les conclusions suivantes : 1° pour la dilution de bactériophage, il est à peu près indifférent d'utiliser ou non l'étaleur (24 p. 100 de plus dans le premier cas). Nous savons, en effet, qu'un bactériophage de petite taille comme le B. 563 (20 μ) est peu sensible au frottement. Comme, d'autre part, dans toutes ces expériences, le temps de frottement a été très court et rigoureusement le même partout, ce facteur n'entre pas en ligne de compte.

Seule intervient, sans doute, une plus égale répartition des corpuscules à la surface de la gélose, ce qui évite l'accolement de plusieurs corpuscules qui ne donneraient ainsi qu'une seule plage.

2° Au contraire, pour la suspension bactérienne, l'emploi de l'étaleur donne un bien plus grand nombre de plages que l'ensemencement sans étaleur (83 p. 100 d'augmentation).

CONCLUSIONS. — Nos expériences, ainsi que les expériences de M. Wollman, montrent nettement que les suspensions bactériennes non homogènes constituent une importante cause d'erreur dans le titrage des bactériophages par la méthode de numération des plages. On peut y remédier en effectuant l'étalement en deux temps au moyen de l'étaleur en prenant soin, si le bactériophage en question est de grande taille, donc sensible au frottement, de pratiquer l'étalement pendant un temps rigoureusement déterminé.

MESURE INTERFÉROMÉTRIQUE DE LA PROFONDEUR DES CHAMBRES CONSTRUITES POUR LA NUMÉRATION DES PARTICULES ULTRAMICROSCOPICIQUES

par J. GIUNTINI et JEAN^C. LEVADITI (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

Pour la mise en évidence et la numération des particules ultramicroscopiques en suspension dans un milieu liquide, des chambres en quartz, construites pour l'ultramicroscope cardioïde, permettent, d'après le nombre des particules dénombrées dans chaque champ microscopique, de calculer le nombre total des particules contenues dans un volume donné.

C. Levaditi (1) a constaté que ces chambres, dont la profondeur est très faible (les chiffres donnés par le constructeur sont compris entre $2\ \mu$ et $2,5\ \mu$) conviennent parfaitement pour l'examen microscopique en luminescence pour lequel la visibilité des particules dépend en partie de la faible épaisseur du liquide examiné.

On conçoit que de telles chambres nécessitent des qualités optiques difficiles à réaliser, toute imprécision dans la construction de la cellule ou toute erreur de montage entraînant des erreurs de numération considérables. C'est pourquoi nous avons effectué une étude optique de la cellule en nous basant sur le principe de la détermination des épaisseurs des lames minces à l'aide des interférences lumineuses.

PRINCIPE. — La profondeur de la chambre est suffisamment faible pour qu'il soit possible d'assimiler les deux faces qui la limitent à une lame mince et de déterminer avec elle l'apparition d'interférences lumineuses. On sait qu'une lame d'air de moins de $1\ \mu$ d'épaisseur paraît colorée lorsqu'elle est éclairée par réflexion et qu'au delà de cette épaisseur les teintes deviennent moins nettes, pour aboutir finalement au blanc dit d'ordre supé-

(*) Communication présentée à la séance du 5 novembre 1942 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) C. LEVADITI, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 849 et ces *Annales*, 1940, **64**, 359 et 466.

rieur. Lorsque cette lumière est analysée à l'aide d'un spectroscopie, le spectre prend l'aspect cannelé.

Dans le spectre obtenu par réflexion, les cannelures sombres correspondent aux longueurs d'onde pour lesquelles $\delta = p\lambda$ ($\delta = 2ne \cos i$ est le retard géométrique). Or, pour deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 correspondant à deux cannelures noires, on a sous incidence normale : $\delta = 2ne = p\lambda_1 = (p + K)\lambda_2$, d'où il est possible de déduire l'épaisseur de la lame :

$$e = \frac{K\lambda_1\lambda_2}{2n(\lambda_1 - \lambda_2)}$$

où K est le nombre de cannelures brillantes comprises entre λ_1 et λ_2 et n l'indice de la lame.

Dans le spectre obtenu par transmission, le phénomène est inversé, les cannelures sombres remplaçant les cannelures brillantes.

RÉALISATION. — Le montage, dont la figure donne un schéma, est réalisé à l'aide d'un microscope binoculaire. Il permet de déterminer l'épaisseur de la cellule en se servant du nombre de cannelures observées soit par réflexion, soit par transmission, suivant que la cellule est vide ou non.

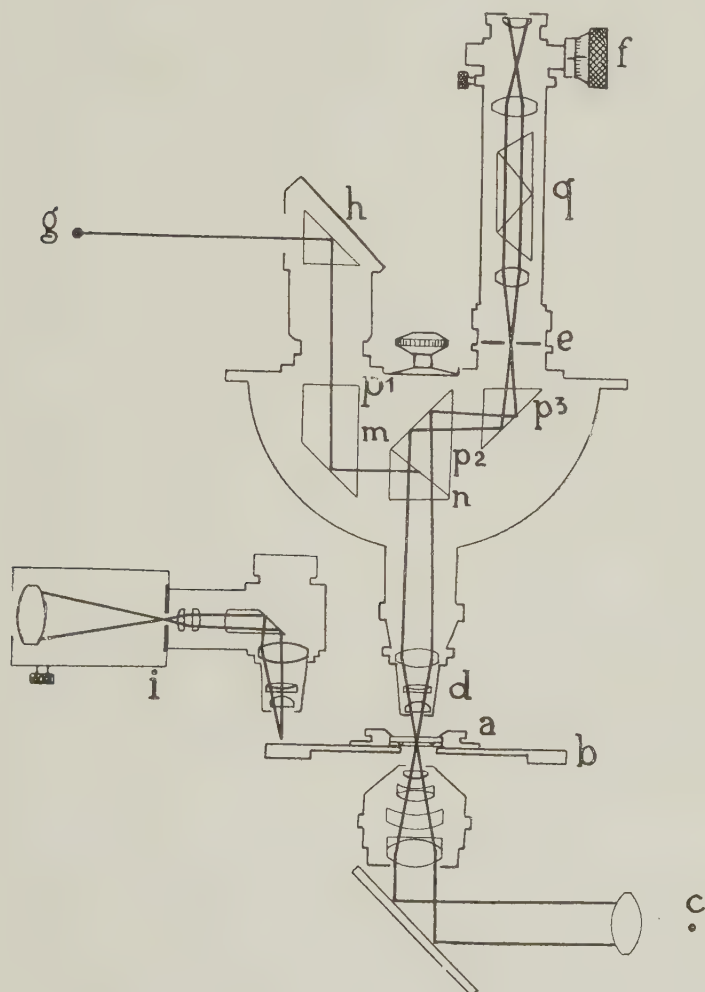
1° *Cellule contenant la suspension à examiner (méthode de mesure par transmission).* — Les deux faces de la cellule qui serviront à l'interférence sont préalablement semi-argentées par voie chimique ; puis cette argenture est enlevée sur la moitié de la surface utile pour permettre les numérations. Afin d'en mesurer l'épaisseur, la cellule (a) est placée sur la platine du microscope (b). Comme l'indique le schéma, la lumière d'un arc électrique (c) éclaire un point de la cellule dont un objectif (d) de faible grossissement (distance focale = 18 mm.) forme l'image sur la fente du spectroscopie (e). L'image du spectre cannelé ainsi obtenu est formée dans le plan focal d'un oculaire micromètre à tambour (f), qui permet de déplacer un indice devant les cannelures.

Pour repérer les longueurs d'onde, la lumière d'un arc au mercure (g) est projetée simultanément sur la fente du spectroscopie à l'aide d'un prisme à réflexion totale (h) placé sur le second tube du binoculaire (raie jaune $\lambda = 5.780 \text{ \AA}$, raie verte $\lambda = 5.461 \text{ \AA}$, raie violette $\lambda = 4.358 \text{ \AA}$). Ainsi, sans étalonnage préalable en longueur d'onde, il suffira de faire coïncider deux cannelures brillantes ou deux cannelures sombres avec les raies de référence choisies λ_1 et λ_2 du mercure pour évaluer rapidement la profondeur de la chambre en comptant le nombre de cannelures K

$$e = \frac{K\lambda_1\lambda_2}{2n(\lambda_1 - \lambda_2)} = K \frac{2,2}{2n} \mu$$

pour $\lambda_1 = 0,5461 \mu$ et $\lambda_2 = 0,4358 \mu$, d'où $e = 0,83 K \mu$ si la chambre est pleine d'eau.

2° *Cellule vide (méthode de mesure par réflexion)*. — Dans ce



cas, il n'y a pas lieu d'argenter les faces de la cuve, le pouvoir réflecteur air-verre (de 4 p. 100) étant suffisant pour que les franges soient visibles. La cellule placée comme précédemment est éclairée sous incidence normale en vissant l'objectif sur un dispositif épidiasscopique (i) contenant un prisme à réflexion totale. Seule la lumière réfléchie sur les faces en regard interférera, les autres

réflexions présentant une différence de marche trop grande pour donner des cannelures visibles. En ce cas, l'épaisseur e par un calcul analogue au précédent sera donnée par la formule $e = 1,1 K \mu$.

RÉSULTATS. — Alors que la profondeur indiquée par le constructeur serait de $2,2 \mu$ à $2,5 \mu$, la profondeur trouvée est de l'ordre de 8 à 12μ et varie à chaque montage, ce qui oblige à mesurer la profondeur réelle de la chambre à chaque numération (2).

Nous avons calculé le volume auquel correspond la surface élémentaire isolée par les disques d'Ehrlich placés dans l'oculaire 20 avec l'objectif 60 (immersion à glycérine) lorsque la profondeur de la chambre est de 10μ :

Disque n° 3 (carré de 2 mm. de côté).	$v = 1039.10^{-8} \text{ mm}^3$
Disque n° 5 (carré de 4 mm. de côté)	$v = 4225.10^{-8} \text{ mm}^3$

ce qui permet aisément de rapporter la moyenne du nombre de particules observé dans chaque champ au nombre de particules contenu par centimètre cube.

Afin de vérifier l'exactitude de ces chiffres, deux expériences ont été réalisées. La première détermine le volume de la chambre par pesée du liquide capable de la remplir. La profondeur trouvée est de l'ordre de 11μ .

Pour la seconde, des numérations d'hématies ont été effectuées comparativement dans la chambre en quartz et dans les chambres de Malassez et de Thoma. Les chiffres suivants, qui concordent parfaitement, ont été obtenus :

Cellule de Thoma	6.260.000 par millimètre cube.	
Cellule de Malassez	5.930.000	—
Chambre en quartz	6.059.000	—
	6.220.000	—

Ces résultats modifient-ils les faits établis par C. Levaditi qui, à l'aide de ces chambres et de la microscopie en luminescence, a réalisé une méthode d'estimation du nombre des corps élémentaires de la vaccine et pu établir des rapports entre les variations quantitatives et qualitatives de ces corpuscules, d'une part, leur nombre par unité de volume d'autre part ?

Aucune des conclusions générales posées par lui à ce sujet n'est

(2) A l'aide d'un plan parfait, il a été possible d'étudier les deux parties de la cellule. La cuve est sphérique, concave (rayon de courbure : 6 m. environ), sa profondeur est $2,5 \mu$ à 3μ ; le couvre-objet d'épaisseur 0,75 mm. n'est pas plan (différences 1 à 2μ). Il est donc naturel, dans ces conditions, que le volume de la cellule soit assez mal défini et qu'une lame d'air d'épaisseur variable soit toujours interposée entre le couvre-objet et les bords de la cuve.

modifiée par ces résultats, tout au plus les chiffres attribués au nombre minimum des corps élémentaires capables de déterminer l'éclosion d'une lésion cutanée visible sont-ils plus élevés qu'il ne paraissait. Ce qui, éloignant encore de l'unité la dose minima vaccino-gène, renforce au contraire les preuves apportées contre l'hypothèse d'après laquelle un seul corpuscule suffirait à déterminer l'apparition d'une lésion cutanée (3).

Par contre, le fait de mesurer pour chaque numération la profondeur de la cellule augmentera la précision des recherches faisant intervenir le rapport de deux concentrations différentes. En ce cas, qui est celui des ultracentrifugations (4), ce n'est pas l'erreur entre la profondeur théorique de la chambre donnée par le constructeur et la profondeur pratique de la cellule qui intervient (5), mais c'est la différence de profondeur d'une mesure à l'autre qui détermine des écarts encore plus considérables du rapport des concentrations.

On ne saurait toutefois, malgré l'amélioration considérable qu'elle constitue, attendre de la méthode de numération des corps élémentaires des virus en luminescence la même précision que la numération des colonies de germes ou des plages déterminées par les bactériophages, qui reste jusqu'ici sans équivalent dans le domaine des ultravirus.

(3) Il en est de même du nombre minimum de tréponèmes capables de déterminer l'apparition d'un syphilome lorsqu'ils sont injectés au lapin par voie intratesticulaire. Ce nombre serait donc compris entre 660 (inactif) et 6.600 (actif), au lieu de 66 à 660 tréponèmes, suivant les expériences de C. Levaditi et J. Levaditi (*C. R. Soc. Biol.*, 1941, 135, 316).

(4) P. LÉPINE, J. LEVADITI et J. GIUNTINI, ces *Annales*, 1941, 65, 477 et 480.

(5) Elles sont du même ordre de grandeur pour chaque mesure.

ÉVALUATION, PAR IRRADIATION ALPHA, DE LA TAILLE DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE (*)

par P. BONÉT-MAURY.

(Institut du Radium [Laboratoire Curie]
et Institut Alfred-Fournier [Service de M. LEVADITI].)

L'irradiation du virus est effectuée, suivant la technique précédemment décrite (1), avec les rayons α du radon. Nos expériences réalisées pour la partie biologique avec C. Levaditi et A. Vaisman, ont porté sur la souche type O. Vallée, mise à notre disposition par M. Verge.

Les suspensions virulentes sont préparées par dilacération dans le liquide de Tyrode (2) de la peau des vésicules prélevées sur la patte arrière du cobaye. On clarifie par centrifugation de cinq minutes à 3.000 tours/minute, puis on ultrafiltre au travers d'une membrane de $2,7 \mu$. La mesure du titre (dilution 50 p. 100) avant et après irradiation est réalisée par inoculation de la suspension virulente dans le derme de la patte postérieure du cobaye ; chaque animal reçoit 2 injections dans chaque patte, soit 4 inoculations par animal. Un titrage comporte l'essai de trois dilutions successives au 1/10 de la suspension virulente, chaque dilution permettant 6 inoculations ; la mesure d'un titre entraîne donc l'examen de 18 réponses possibles. Nous n'avons pu utiliser ici les méthodes statistiques précédemment décrites (3), car la courbe de virulence présente une pente si rapide que le pourcentage de réponses positives passe de 100 à 0, par une seule dilution au 1/10. La détermination de la partie médiane de la courbe de virulence nécessiterait l'emploi de dilutions plus rapprochées et plus nombreuses (pour encadrer avec certitude la dilution 50 p. 100), c'est-à-dire d'un nombre d'animaux trop élevé pour nos possibilités actuelles. Le titrage permet donc seulement de fixer la place de la dilution 50 p. 100, entre deux dilutions

(*) Communication présentée à la séance du 3 décembre 1942 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) BONÉT-MAURY, ces *Annales*, 1942, **68**, 245 et *J. Chim. Phys.*, 1942, **39**, 116.

(2) Nous avons vérifié que le liquide de Tyrode irradié n'a aucune action sur le titre du virus.

(3) BONÉT-MAURY, ces *Annales*, 1942, **68**, 491.

successives au $1/10$, sans pouvoir mieux préciser sa valeur. Cette incertitude est traduite sur la figure 1, représentant la courbe d'inactivation du virus par l'emploi de traits verticaux limitant la position possible du titre ; la courbe est construite en coordonnées semi-logarithmiques, car, avec cette représentation, on a de fortes raisons de penser qu'elle est rectiligne. A partir de cette courbe, on obtient facilement la valeur de la dose Δ_{10} de radon, équivalente pour l'affaiblissement du titre à une dilution au $1/10$: $\Delta_{10} = 600 \mu\text{cd}$ par centimètre cube. Le diamètre de la

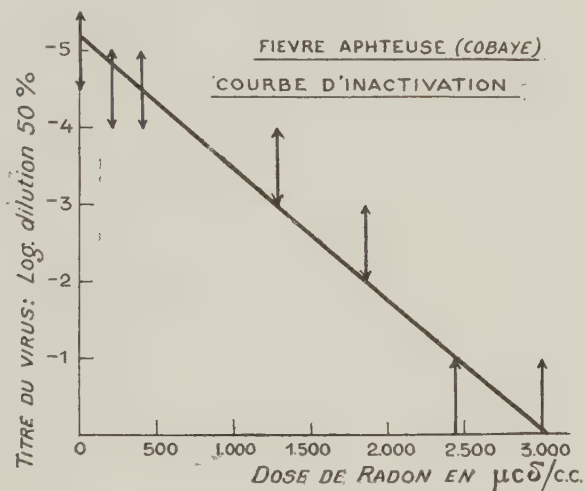


FIG. 1.

section efficace brute du virus, pour les particules α du radon, se calcule par la formule précédemment donnée (1) :

$$d = \frac{980}{\sqrt{\Delta_{10}}} \text{ m}\mu.$$

On trouve finalement :

$$d = 40 \text{ m}\mu,$$

c'est-à-dire un diamètre brut du même ordre que celui assigné par la même méthode (1) à la molécule d'hémocyanine d'*Helix pomatia* (constituant principal), soit $38 \text{ m}\mu$, l'écart observé étant de l'ordre des erreurs d'expériences (4). Pour passer à la section efficace réelle, il faut déduire de d le diamètre du cylindre d'ioni-

(4) La précision sur d est liée seulement à celle sur Δ_{10} , et comme cette grandeur intervient par sa racine, une incertitude de $100 \text{ m}\mu$ sur Δ_{10} n'entraîne sur d qu'un écart de quelques $\text{m}\mu$. C'est là un avantage certain de la méthode d'irradiation.

sation α . Fixé par Iaffé à 40 $m\mu$, il est estimé par d'autres physiologistes à quelques $m\mu$.

Cette correction, peu importante pour les gros virus (vaccine, herpès), va jouer maintenant un grand rôle et la détermination de sa valeur exacte serait hautement désirable. Nous avons, avec M. Frilley, espéré la mesurer au moyen d'une méthode photographique directe, mais les résultats obtenus ont été décevants. Pour essayer d'évaluer cette correction, nous avons comparé les dimensions données par l'irradiation α avec celles des autres méthodes de mesures appliquées à la molécule d'hémocyanine d'*Helix pomatia* [tableau I A] (5). D'après les expériences de Svedberg et Brohult, nous avons pensé que cette correction ne dépassait pas quelques $m\mu$, en adoptant la section efficace calculée par ces auteurs d'après la centrifugation. Mais si l'on utilise les données d'autres auteurs relatives également à la centrifugation, la correction paraît atteindre 15 $m\mu$ environ.

Par la micrographie électronique, v. Ardenne évalue le diamètre de l'hémocyanine à 20 $m\mu$, ce qui fixe la correction à 20 $m\mu$; le cliché est cependant trop flou pour pouvoir faire une statistique précise. Enfin, d'après l'ultrafiltration, la correction serait de l'ordre de 14 $m\mu$. Il apparaît donc que cette correction doit sans doute être inférieure à 20 $m\mu$, sans qu'on puisse fixer exactement sa valeur (6).

La comparaison des données relatives au virus de la fièvre aphteuse confirme (tableau I B.) que les différentes méthodes assignent aux corpuscules virulents des dimensions moyennes voisines de celles de la molécule d'hémocyanine, sauf l'ultrafiltration,

(5) Il s'agit naturellement de fixer seulement un ordre de grandeur, car les dimensions données par des méthodes différentes ne sont pas toujours comparables; nous avons précisé, dans la dernière colonne du tableau I, la grandeur atteinte par chacune des méthodes citées. La notion de taille n'a de sens précis que pour des corpuscules sphériques, si l'on ne mesure qu'une dimension.

(6) Nous avons fait figurer dans le tableau I, pour être complet, la micrographie en U. V., mais ses résultats ne sont pas utilisables. En effet, Barnard, d'après ses très remarquables clichés, considère que le diamètre des plus petits corpuscules est de l'ordre de 40 $m\mu$, valeur qui serait en excellent accord avec la nôtre. Malheureusement, outre que le pouvoir de résolution en U. V. ne dépasse pas 80 $m\mu$, cette valeur de 40 $m\mu$ ne correspond à aucune valeur définie du cliché. Nous avons relevé, par les méthodes statistiques classiques, les dimensions des corpuscules sur des agrandissements des clichés de Barnard. On ne peut expliquer le diamètre moyen obtenu ($d = 300 m\mu$), qu'en considérant les corpuscules photographiés comme différents en totalité, ou en partie, de l'agent pathogène vrai; on peut penser que les corpuscules virulents sont accompagnés de particules inactives, analogues aux corpuscules normaux découverts par C. Levaditi pour le virus vaccinal.

MÉTHODE	AUTEURS	VALEURS		DIAMÈTRE du cylindre α	DIMENSIONS MESURÉES					
		moyenne	extrême							
A. — Dimensions de la molécule d'hémocyanine d'Helix pomatia en $m\mu$:										
Centrifugation	(6)	46		0	Diamètre de la section efficace pour les α . Diamètre de la section efficace pour les électrons (estimation grossière). Diamètre des pores du filtre multiplié par un facteur correctif (point terminal : 55 $m\mu$).					
	(5)	24		44						
	(4)	22		16						
	(7)	35		5						
	(6)	28	18-38	2)						
Irradiation α . Micrographie électronique	(2)	20 (?)								
	(3)	23	18-28	45						
Ultrafiltration										
B. — Dimensions du virus de la fièvre aphteuse en $m\mu$:										
Centrifugation	(41)	30		40	$5 \times 40 - 12$ $4 \text{ à } 9 \times 40 - 12$ $4 \text{ à } 9 \times 40 - 13$ $1,7 \text{ à } 2,8 \times 10 - 12$	1,40	6×10^6			
	(42)	25		45						
	(14)	20		20						
	(42)	20	16-23	20						
	(42)	47	14-20	23						
Irradiation γ . Micrographie électronique Micrographie en U.V.	(15)	30	20-40							
	(15)	25 (?)	20-30	45		Cliché très flou (estimation grossière). Diamètre des plus petits corpuscules (Barnard). Diamètre de la section efficace pour les photons. Point terminal : 25. Point terminal : 48-13.				
	(16)	40 (?)								
	(8)	300	γ — 33 p. 400							
	(8)	40	8-42	30						
Ultrafiltration	(9)	42	7-16	28						

(1) SVEBERG et BROHULT, 1936, 1939, 1943, 339. (2) V. ARDENNE, *Naturwiss.*, 1940, 28, 114. (3) ELFORD, *Biochem. J.*, 1936, 30, 84. (4) ELFORD, *J. exp. Pathol.*, 1936, 17, 399 (s_{20} : $9,7 \times 10^{-12}$; d : 1,36). (5) SVEBERG et CHIRNOAGA, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1928, 50, 1399. (6) Calculé à partir des données de Svedberg et Brohult (1). (7) Calculé à partir des données de Dervichian, *J. Chim. Phys.*, 1941, 48, 59. (8) GALLOWAY et ELFORD, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1936, 17, 187. (9) KRASSNOFF et RENÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 424, 790. (10) PXL et V. ARDENNE, *Naturwiss.*, 1940, 28, 531. (11) BUSCH, *Zeitschr. Immun.-titel.*, 1934, 83, 470. (12) SCHLESINGER et GALLOWAY, *J. Hyg.*, 1937, 37, 445. (13) JANSSEN, *Naturwiss.*, 1941, 29, 102. (14) ELFORD et GALLOWAY, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1937, 18, 155. (15) BARNARD, *Proc. Roy. Soc. B.*, 1937, 37, 445. (16) BONET-MAURY. Mesures exécutées sur 28 corpuscules pris sur des agrandissements de clichés de Barnard; 14 corpuscules sur un cliché en lumière transmise et 14 sur un cliché sur fond noir. Ces deux séries correspon-
daient aux mêmes corpuscules d'une même préparation.

(1) SVEDBERG et BROHULT, *Nature*, 1939, 143, 939. (2) V. ARDENNE, *Naturwiss.*, 1940, 28, 114. (3) ELFORD, *Biochem. J.*, 1936, 30, 84. (4) ELFORD, *J. exp. Pathol.*, 1936, 17, 399 (s_{20} : $5,7 \times 10^{-12}$, d : 1.36). (5) SVEDBERG et CHIRNOGA, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1928, 50, 1359. (6) Calculé à partir des données de Svedberg et Brohult (1). (7) Calculé à partir des données de Dervichian, *J. Chim. Phys.*, 1941, 48, 59. (8) GALLOWAY et ELFORD, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1936, 17, 187. (9) KRASSNOFF et REINÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, 750. (10) PVL et V. ARDENNE, *Naturwiss.*, 1940, 28, 531. (11) BUSCH, *Zeitschr. Immunopathol.*, 1934, 82, 170. (12) SCHLESINGER et GALLOWAY, *J. Hyg.*, 1937, 37, 445. (13) JANSSEN, *Naturwiss.*, 1941, 29, 102. (14) ELFORD et GALLOWAY, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1937, 18, 155. (15) BARNARD, *Proc. Roy. Soc. B.*, 1937, 37, 445. (16) BONET-MAURY. Mesures exécutées sur 28 corpuscules pris sur des agrandissements de clichés de Barnard : 14 corpuscules sur un cliché en lumière transmise et 14 sur un cliché sur fond noir. Ces deux séries correspondaient aux mêmes corpuscules d'une même préparation.

qui donne une valeur notablement plus petite, sans doute pour les raisons que nous avons déjà signalées (1). Il faut également noter que Janssen, dans un récent travail, obtient, par centrifugation, un poids moléculaire beaucoup plus petit (1.000.000 à 500.000 au lieu de 6×10^6) correspondant à des dimensions plus faibles ; il semble que ces expériences, conduites dans de très bonnes conditions, portent sur une protéine déjà très purifiée, mais dont la virulence n'est pas précisée.

CONCLUSION. — L'irradiation α assigne au virus de la fièvre aphteuse des dimensions (section efficace) très voisines de celles de la molécule d'hémocyanine. Le diamètre, évalué par cette méthode, est compris entre 20 et 40 m μ , soit en moyenne 30 m μ ; il est supérieur aux dimensions classiquement admises d'après l'ultrafiltration, soit 10-12 m μ (7). D'après ces résultats, les premières grosses molécules capables de se multiplier, c'est-à-dire les plus petits virus pathogènes, auraient un volume du même ordre que celui des dernières protéines inactives, les deux domaines n'admettant qu'une zone de passage assez étroite, comme si le pouvoir de multiplication apparaissait dès qu'une certaine complexité minimum de l'édifice atomique est atteinte. Ce point de vue serait en accord avec les expériences de Kausche, Pfankuch et H. Ruska (8), indiquant une liaison entre la virulence de la mosaïque du tabac et la taille des para-cristaux, modifiée par les ultra-sons, sous le contrôle de la micrographie électronique.

(7) Comme le montre la discussion précédente, les données sont insuffisantes actuellement pour qu'on puisse comparer le diamètre radiosensible avec les dimensions extérieures des corpuscules, afin d'obtenir quelques renseignements sur la structure du virus.

(8) KAUSCHE, PFANKUCH et RUSKA, *Naturwiss*, 1941, **29**, 573.

SUR LA FERMENTATION β -HYDROXYBUTYRIQUE PRODUITE PAR LE BACILLE M DE LEMOIGNE

par P. HEITZMANN.

(Institut Pasteur, Service des fermentations.)

La présence de l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine a été signalée par Külz et Minkowsky. On le trouve en grandes quantités, ainsi que l'acétone et l'acide acétylacétique, dans l'urine des diabétiques, et on a eu l'habitude de grouper ces trois corps qui sont considérés comme des produits anormaux du métabolisme animal sous le terme impropre de corps acétoniques.

On savait qu'une alimentation pauvre en glucides, riche en graisses, provoquait chez le malade une acétonurie marquée que l'on attribuait soit au manque de glucides, soit à un mécanisme dérégulé où les glucides pourraient intervenir. Toutes les premières études se rattachaient à la clinique du diabète et ont surtout fait entrevoir la complexité du phénomène.

Il revient à Lemoigne (1, 2) d'avoir montré que la production d'acide β -hydroxybutyrique n'était pas seulement le propre des organismes supérieurs mais pouvait aussi se produire par fermentation bactérienne à partir du glucose.

Un bacille voisin du *B. megatherium* que nous désignerons dorénavant sous le nom de bacille M (2 bis) est capable d'accumuler en lui-même un corps cristallisable (3, 4) facilement soluble dans le chloroforme, appelé « Corps Y », de formule brute $(C_4H_6O_2)^n$. C'est un polymère de l'acide crotonique qui redonne cet acide et de l'acide β -hydroxybutyrique par hydrolyse alcaline.

(1) LEMOIGNE, *C. R. Acad. Sc.*, 1923, **176**, 1761.

(2) LEMOIGNE, ces *Annales*, 1925, **39**, 144.

(2 bis) LEMOIGNE a trouvé le bacille M dans presque toutes les terres dont il a effectué l'analyse bactériologique. C'est un bacille sporulé restant coloré par la méthode de Gram. Il liquéfie rapidement la gélatine ainsi que la caséine qu'il précipite du lait. Cette dernière digestion se fait, contrairement à ce qui se produit avec la plupart des bacilles sporulés, en milieu fortement acide. Aérobie strict, le bacille M ne forme pas de voile, il pousse très mal dans les milieux liquides. Au contraire, dans les milieux solides, en surface, il donne des cultures extrêmement abondantes.

(3) LEMOIGNE, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1926, **8**, 770.

(4) LEMOIGNE, ces *Annales*, 1927, **41**, 148.

Le corps Y qui forme jusqu'à 26 p. 100 du poids sec des bacilles M peut être considéré comme une matière de réserve assimilable. Sa désintégration biologique libère de l'acide β -hydroxybutyrique que M. Lemoigne a isolé presque à l'état pur dans les liquides d'autolysat des bacilles M. Cet acide est optiquement actif et dévie à gauche le plan de polarisation de la lumière comme celui que l'on isole à partir de l'urine. L'autolyse se produit lorsque les corps bactériens sont mis en émulsion dans l'eau à la température des réactions biologiques. A 30°, elle dure plusieurs jours.

Une même origine et l'interdépendance des corps cétoniques ne font aucun doute. Si l'on a soutenu que le précurseur de l'acide β -hydroxybutyrique était uniquement l'acide butyrique qui s'oxyderait en β suivant la règle de Knoop, on a vu que les corps cétoniques sont aussi formés à partir des composés à deux et trois atomes de carbone comme cela fut d'abord démontré avec le foie par les travaux de Embden et de son école.

Embden et Oppenheimer (5) montrent que la perfusion du foie avec l'acide pyruvique donne une augmentation de la formation d'acide acétylacétique. Annau (6) et Edson (7) travaillant avec du foie en coupes ou haché confirment ce résultat. Loeb (8) dans les laboratoires de Embden montre que l'acide acétique accroît la proportion d'acide acétylacétique dans le foie, effet qui est prononcé selon Friedmann (9) dans le foie des animaux en état d'inanition. Weil-Malherbe (10) rapporte la formation d'acide acétylacétique à partir de l'acide pyruvique dans le tissu cérébral.

Dans le foie se trouve une diastase isolée par Dakin et Wakeman (11) transformant l'acide β -hydroxybutyrique en acide acétylacétique. Plus récemment Green, Dewan, Leloir (12) ont préparé cette déshydrogénase à partir du muscle cardiaque et ont montré que le coenzyme I (nucléotide diphosphopyridinique) était un complément nécessaire. Mais le *Clostridium acetobutylicum*, qui est capable de décarboxyler l'acide acétylacétique [Johnson, Peterson, Fred (13)] pour donner de l'acétone, est inactif vis-à-vis de l'acide β -hydroxybutyrique.

On a soutenu une origine aldolique de l'acide β -hydroxybu-

(5) EMBDEN et OPPENHEIMER, *Bioch. Z.*, 1913, **55**, 535.

(6) ANNAU, *Hopp. Seyl. Z.*, 1934, **224**, 141.

(7) EDSON, *Bioch. J.*, 1935, **29**, 2082.

(8) LOEB, *Bioch. Z.*, 1912, **47**, 118.

(9) FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1913, **55**, 436.

(10) WEIL-MALHERBE, *J. Soc. Chem. Ind. Lond.*, 1936, **55**, 838.

(11) WAKEMAN et DAKIN, *J. Biol. Chem.*, 1909, **6**, 373.

(12) GREEN, DEWAN et LOLOIR, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 934.

(13) JOHNSON, PETERSON et FRED, *J. Biol. Chem.*, 1933, **101**, 145.

tyrique ; Krebs (14), au contraire, envisagerait une origine pyruvique de cet acide par formation intermédiaire d'acide acétopyruvique.

Il nous a semblé qu'il serait intéressant de s'attacher au métabolisme glucidique du bacille M dont la spécificité déjà reconnue pourrait éclairer ce qui se passe dans l'organisme des animaux supérieurs où nous avons probablement une superposition plus grande des phénomènes. L'utilisation d'organismes inférieurs, *a priori* plus simples que la cellule d'un organe d'un être évolué, paraît indiquée pour ce genre de recherches.

Sur la proposition de M. Lemoigne, nous avons entrepris ce travail qui est une étude du métabolisme glucidique chez ce bacille M de Lemoigne.

I. — Oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

Devant les résultats négatifs obtenus dans la recherche d'une glycolyse phosphorylante (15), nous nous sommes demandé si le bacille M n'était pas capable de former de l'acide β -hydroxybutyrique aux dépens de l'acide acétylacétique. La disparition de ce dernier acide observée dans l'organisme des diabétiques se produit aussi avec la levure en l'absence de sucre, Lundin (16). Utilisant ces résultats, St. Weiss et M. Altaï (17) trouvent que l'acide acétylacétique disparaît en plus fortes proportions si du sucre est ajouté à la levure.

Mais il revient à Friedmann (18) d'avoir étudié de plus près ce phénomène. Cet auteur montre d'abord qu'avec la levure, l'acide acétylacétique est réduit et donne naissance à de l'acide β -hydroxybutyrique déviant à droite le plan de polarisation de la lumière. Après avoir précisé les meilleures conditions dans lesquelles se fait cette oxydo-réduction, le pH optimum étant de 2 (à pH 6-8, l'activité est environ trois fois plus faible), il étudie l'influence des concentrations. Il en arrive à prendre 4 g. de levure pour 10 c. c. de liquide, une concentration en glucose de 20 p. 100 et en acide acétylacétique de 0,4 p. 100. Toutefois, il est à remarquer que la proportion d'acide acétylacétique transformé ne varie que dans de faibles limites (de 40 à 60 p. 100) avec ces deux dernières concentrations. Le toluol n'inhibe pas ces transformations.

(14) KREBS et JOHNSON, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 645 et 772.

(15) HEITZMANN, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1941, **23**, 453.

(16) LUNDIN, *Bioch. Z.*, 1923, **142**, 463.

(17) WEISS et ALTAÏ, *Zeitschr. exp. Med.*, 1925, **47**, 606.

(18) FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1931, **243**, 125.

D'une étude quantitative (19, 20, 21), il résulte que l'acide acétylacétique disparaît suivant deux processus. Le premier, c'est la formation d'acide β -hydroxybutyrique qui se forme en présence de sucre pendant les huit premières heures d'incubation (80 p. 100 sont ainsi transformés) et qui ne se produit pas en l'absence de sucre. C'est un processus lié à la fermentation. Le deuxième se superpose au premier, il est quatre fois plus lent et ne produit pas d'acide alcool. Il peut se poursuivre avec la même vitesse pendant quarante-huit heures.

Sur l'acide β -hydroxybutyrique que l'on dose par oxydation par le bichromate, il n'y en a que 62 à 66 p. 100 d'actif, par conséquent dosable par polarimétrie.

Friedmann n'apporte aucun éclaircissement sur le deuxième processus et n'examine pas si l'acétone qui provient de la décarboxylation de l'acide acétylacétique (20 à 30 p. 100 sont décarboxylés en seize heures) n'a pas été perdue au cours des traitements ou réduite pour donner naissance à de l'alcool isopropylique (22).

A côté de l'acide β -hydroxybutyrique, Friedmann trouve l'acide lactique qu'il attribuait à la présence d'un bacille lactique dans la levure de boulangerie du commerce qu'il utilisait. Pourtant, cet acide se rencontre souvent; les mémoires le concernant sont trop nombreux pour que nous puissions les passer en revue ici. On le retrouve dans bien des fermentations, surtout quand on a soin de maintenir le pH du milieu au voisinage de la neutralité par un procédé quelconque. Fernbach et Schoen (23) démontrent la présence d'acide lactique à côté de l'acide pyruvique lorsqu'on ajoute de la craie à la levure. C'est aussi en utilisant cet artifice que Buchner et Meisenheimer (24) isolent l'acide lactique avec le *B. butylicus* de Fitz. Cet acide se retrouve aussi avec d'autres ferments butyriques : Neuberger et Arenstein (25); avec les ferments propioniques : Fitz (1880). Fromageot et Tatum (26). Phelps, Johnson et Peterson (27).

Aubel (28) signale la formation d'acide lactique par le *B. pyocyannique* et en étudie le métabolisme ainsi que celui de l'acide pyruvique (29).

(19) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 42.

(20) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 57.

(21) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 69.

(22) LANGLYKHE, PETERSON et FRED, *J. Bact.*, 1937, **34**, 443.

(23) FERNBACH et SCHOEN, *C. R.*, 1920, **170**, 764.

(24) BUCHNER et MEISENHEIMER, *Ber. D. Ch. G.*, 1908, **41**, 1410-1419.

(25) NEUBERG et ARENSTEIN, *Bioch. Z.*, 1921, **117**, 269.

(26) FROMAGEOT et TATUM, *Bioch. Z.*, 1933, **267**, 360.

(27) PHELPS, JOHNSON et PETERSON, *Bioch. J.*, 1939, **33**, 1006.

(28) AUBEL, *C. R.*, 1921, **173**, 1493.

(29) AUBEL, *C. R.*, 1923, **176**, 332.

L. F. Hewit (30) obtient de l'acide lactique avec le *streptocoque hémolytique*.

La chaîne des étapes de la fermentation lactique par l'intermédiaire de l'hexose diphosphate, de l'acide phosphoglycérique, l'acide pyruvique est désormais classique. Virtanen (31) isole, tout comme avec la levure, du zymophosphate avec le *B. casei* en présence de toluène. Mais il faut remarquer que l'acide lactique est aussi produit par des bacilles pour lesquels on n'a pas trouvé de glycolyse phosphorylante. Et nous pouvons nous poser la question de l'unité des fermentations lactiques. Car justement nous allons voir que le bacille M, en présence de glucose, est capable de transformer l'acide acétylacétique en acide β -hydroxybutyrique gauche. Il se forme simultanément de l'acide lactique, production qui est liée à l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

Dans son mémoire, Friedmann (32) s'est borné à déterminer les rapports existant entre l'acide acétylacétique disparu et l'acide β -hydroxybutyrique formé. Il n'a pas tenté de voir ce que devenait le glucose dans cette opération, omission d'ailleurs compréhensible car la levure pour cette étude est un organisme mal choisi : 1° Friedmann utilisait la levure de boulangerie du commerce qui n'est pas forcément une culture pure, ce qui fait qu'il pouvait attribuer l'acide lactique formé à une bactérie lactique ; 2° la levure fermente le glucose aussi bien, sinon mieux, en anaérobiose qu'en aérobiose, de sorte que les phénomènes se superposent et sont, par conséquent, difficiles à séparer, malgré l'addition de toluène ; 3° la quantité de levure utilisée est relativement considérable, 4 g. de levure fraîche pour 10 c. c. de liquide. La matière contenue dans la levure ne reste pas inactive, les substances de réserve peuvent en principe influencer de manière considérable dans un bilan. Le bacille M qui, nous le verrons, a une glycolyse très faible en anaérobiose et que l'on peut obtenir facilement en cultures pures est, au contraire, tout indiqué pour étudier les produits liés à l'oxydo-réduction qui existe entre le glucose et l'acide acétylacétique.

Faudra-t-il aussi s'attendre à pouvoir isoler ce phénomène et dresser un bilan exact ? Evidemment non. Toute cellule vivante, même si elle est dans un milieu dépourvu de toute matière nutritive, continue à respirer, elle brûle ses dernières matières de réserve en même temps qu'il s'effectue d'autres transformations intracellulaires, quand cela ne serait que la sporulation. A ces phénomènes vient s'ajouter celui de l'autolyse, Lemoigne (33).

(30) L. F. HEWIT, *Bioch. J.*, 1932, **26**, 208-217.

(31) VIRTANEN, *Hopp. Seyl. Z.*, 1924, **138**, 136-143.

(32) *Loc. cit.*, nos 19, 20, 21.

(33) *Loc. cit.*, n° 2.

De même l'acétylacétate pourra disparaître en oxydant les matières de réserve que le glucose seul est peut-être capable de reconstituer en partie.

Néanmoins, nous trouverons dans l'action du bacille M sur le mélange glucose-acide acétylacétique des différences appréciables avec les témoins pour en tirer des conclusions indiscutables.

Avant d'aborder l'étude quantitative de l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique, précisons quelques détails expérimentaux.

MÉTHODES.

A. Au cours de ce travail nous avons été amenés à caractériser les acides acétique, lactique, β -hydroxybutyrique.

L'acide acétique est caractérisé par une courbe de Duclaux.

L'acide lactique est séparé de l'acide β -hydroxybutyrique en utilisant la propriété de ce dernier de se transformer par chauffage en acide crotonique volatil. Le lactide restant est hydrolysé, on fait le sel de zinc que l'on purifie et caractérise.

L'acide β -hydroxybutyrique est caractérisé par son fort pouvoir rotatoire et sa transformation par chauffage en acide crotonique. On trouve l'acide gauche.

L'acide acétylacétique est caractérisé par la réaction de Legal et la réaction au perchlorure de fer, ainsi que par son caractère acide et son instabilité à 100°.

B. Les bactéries sont cultivées sur moût de bière gélosé d'après Lemoigne.

C. L'acétylacétate de potassium est préparé d'après Friedmann.

D. Comme nous opérons en milieu bicarbonaté, l'acidité formée sera mesurée par le dégagement de gaz carbonique suivant la technique de Warburg. Il faudra tenir compte d'un coefficient de rétention.

Le glucose est dosé suivant la méthode de G. Bertrand.

L'acétone et l'acide acétylacétique sont dosés suivant Mesinger (34).

Pour le dosage spécifique de l'acide acétylacétique, si les techniques de Folin (35) et de Fleury et Awad (36) donnent d'excellents résultats, elles sont longues à mettre en œuvre et se prêtent mal à des dosages en série.

L'utilisation de la réaction de Legal permet, comme nous l'avons montré (37), de faire rapidement des mesures en série. La précision relative est bonne.

(34) J. MESSINGER, *B. der D. Ch. G.*, 1888, **21**, 3366.

(35) FOLIN, *J. Biol. chem.*, 1907, **3**, 117.

(36) FLEURY et AWAD, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1926, **8**, 221 et 250.

(37) HEITZMANN, *Thèse Paris*, 1942.

A 0,5 c. c. de la liqueur à analyser contenant de 3 à 60 γ d'acide acétylacétique, on ajoute 4 c. c. d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, 0,2 c. c. de nitroprussiate de sodium 4 p. 100 (on dissout 0,4 g. de nitroprussiate dans 2 c. c. d'eau, on ajoute de l'acide acétique jusqu'à 10 c. c.), et 1 c. c. d'ammoniaque à 20 p. 100. On fait les mesures au colorimètre de Meunier neuf à douze minutes après avoir fait le mélange. La coloration suit la loi de Beer. Les lectures sont faites au moment où la coloration est stable et maximum. Ce maximum dépend des concentrations des réactifs et de la température. Il est nécessaire de déterminer au préalable le moment où se produit ce maximum ainsi que la valeur d'une division du colorimètre à l'aide d'une solution d'acétylacétate fraîchement préparée et conservée à la glacière. Cette solution est titrée au préalable suivant Messinger.

L'acétone donne une coloration identique dont le maximum est plus lent à s'établir et d'intensité vingt-quatre fois plus faible. Elle ne gêne donc pas lorsqu'elle est en petites quantités.

L'acide lactique est dosé suivant la technique de Lieb et Zicherl (38) avec un appareil de Franke muni d'un barboteur à verre fritté. Nous avons vérifié que l'acide β -hydroxybutyrique, dans les proportions où nous le trouvons dans nos liqueurs, ne troublait pas le dosage.

L'acide β -hydroxybutyrique est dosé par la méthode de Shaffer (39). Mais il est nécessaire de détruire l'aldéhyde provenant de l'oxydation de l'acide lactique. Nous avons montré (37) que l'on pouvait utiliser à cet effet le réactif de Tollens. Au premier distillat, contenant de 5 à 10 mg. d'acétone, amené à 100 c. c., on ajoute 4 c. c. de réactif de Tollens et 1 goutte de sulfate de manganèse à 4 p. 100. On laisse agir un quart d'heure, on acidule par l'acide phosphorique, on distille et on dose l'acétone dans le distillat.

Remarque : Pour doser ces deux derniers acides, il est nécessaire d'éliminer au préalable le glucose par défécation à la chaux et au sulfate de cuivre.

L'acide acétique est dosé suivant la méthode de Duclaux en utilisant la remarque de Virtanen (40).

ETUDE QUANTITATIVE.

Pour une étude quantitative de la glycolyse, la principale perturbation que nous rencontrerons est l'autolyse ; il faut donc chercher à rendre cette dernière relativement faible, ce qui nous conduit à étudier successivement l'influence du pH, du nombre des lavages, de l'âge de la culture et des concentrations sur l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

(38) LIEB et ZICHERL, *Hopp. Seyl.*, 1932, **211**, 211.

(39) SHAFFER, *J. Biol. Chem.*, 1908, **5**, 211.

(40) VIRTANEN et PULKKI, *J. Am. Soc.*, 1928, **50**, 3138.

A. *Influence du pH.* — L'acidité formée au cours de l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique ralentit celle-ci. Ce qui nous amène à n'étudier la glycolyse qu'en milieu tamponné par le bicarbonate sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO_2 . Les activités de l'autolyse ou de la glycolyse s'évalueront donc en mesurant le dégagement de gaz carbonique.

B. *Influence des lavages.* — Pour faire un bilan exact des transformations, il est nécessaire de laver les bacilles avec une solution isotonique. Nous avons vérifié que si ces lavages sont faits à une température inférieure à $10-15^\circ$, l'activité de la glycolyse ne diminue pas, tandis que l'acidité libérée sans substrat diminue à mesure qu'augmente le nombre des lavages.

C. *Influence de l'âge de la culture.* — L'activité de l'oxydo-réduction passe par un maximum très prononcé qui coïncide à peu près avec le moment où la croissance a atteint son maximum. Malgré tout, cette activité est très variable et n'est pas exactement reproductible d'une expérience à l'autre.

D. *Influence des concentrations en glucose et en acide acétylacétique.* — Elles ont relativement peu d'influence. Ceci dit, pour étudier quantitativement l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique, nous opérons comme suit :

A l'aide d'une raclette métallique, on récolte vingt-deux heures après l'ensemencement la culture des bacilles M, sur deux boîtes de Nicolle (moût de bière). On en a obtenu 24 g., on place cette récolte dans un flacon avec des billes de verre, on ajoute 20 c. c. de ClK 0,9 p. 100. On ferme le flacon avec un bouchon de caoutchouc, on agite le tout à l'aide de la machine à secousses pendant vingt minutes afin d'avoir une émulsion bien homogène. On répartit ensuite cette émulsion que l'on allonge de ClK 0,9 p. 100 dans des tubes à centrifuger de 35 c. c. chacun. On centrifuge trente minutes. On décante. On remplit à nouveau les tubes à centrifuger avec de la solution de ClK dans laquelle on réémulsionne les bacilles. On centrifuge encore une demi-heure et on décante à nouveau. Finalement on ajoute au culot de centrifugation de la solution de ClK, de manière à obtenir un volume égal à quatre fois le poids des bacilles, soit 96 c. c. On y ajoute $3 \times 24 = 72$ c. c. d'eau, 48 c. c. de bicarbonate de sodium à 5 p. 100. On obtient ainsi l'émulsion E.

a) A 27 c. c. de E, on ajoute 6 c. c. d'eau, c'est l'émulsion E_A .

b) A 27 c. c. de E, on ajoute 3 c. c. de glucose 10 p. 100 et 3 c. c. d'eau, c'est l'émulsion E_B .

c) A 18 c. c. de E, on ajoute 2 c. c. d'eau et 2 c. c. acétylacétate de potassium 0,94 M/l, c'est l'émulsion E_C .

d) A 126 c. c. de E, on ajoute 14 c. c. de glucose 10 p. 100 et 14 c. c. acétylacétate de potassium 0,94 M/l, c'est l'émulsion E_D .

On place dans les cupules de Warburg 1 c. c. de chacune des émulsions afin de mesurer l'acidité libérée.

Une autre partie est conservée à 0°. Le reste incube dans des récipients agités constamment sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO₂, tout comme les cupules, dans un thermostat à 31°. Après une incubation de cinq heures trois quarts, ces récipients sont retirés du thermostat, refroidis à 0° et on centrifuge leur contenu à une température inférieure à 15°.

Dans les liquides privés de bacilles, on effectuera les dosages de glucose, d'acétylacétate, d'acides lactique, β -hydroxybutyrique et acétique par les méthodes décrites précédemment. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I.

PAR C. C. DE L'ÉMULSION INITIALE	E _A	E _B	E _C	E _D
	mg.	mg.	mg.	mg.
Glucose ajouté		9		9
Acide acétylacétique ajouté			9	9
Bacilles frais	90	90	90	90
Bacilles secs (masse approximative)	10	10	10	10
Bicarbonate de Na ajouté	9,1	9,1	9,1	9,1
Après incubation de 5 h. 3/4 à 31° (N ₂ , 10 p. 100 CO ₂) par c. c. :				
Glucose disparu . . . { en mgr.		1,34	"	7,52
{ 10 ⁻⁶ Mol.		7,46	"	41,8
Acide acétylacétique { en mgr.			1,5	4,76
disparu { 10 ⁻⁶ Mol.			14,7	46,6
Acide lactique formé. { en mgr.	0,113	0,87	0,031	4,77
{ 10 ⁻⁶ Mol.	1,25	9,67	0,56	53
Acide β -hydroxybuty- { en mgr.	0,493			4,85
rique formé { 10 ⁻⁶ Mol.	4,74			46,7
Acide acétique formé. { en mgr.				1
{ 10 ⁻⁶ Mol.				16,7
Acidité libérée. . . . { en mgr.	0,44	0,51	0,48	2,93
{ 10 ⁻⁶ Mol.	19,6	22,7	21,4	131

L'acidité libérée au cours de l'incubation se lit sur les courbes de la figure 1.

Cette expérience a été reproduite plusieurs fois avec les mêmes proportions de réactifs. Dans le tableau II nous donnons les résultats obtenus pour l'acidité dégagée, le glucose et l'acide acétylacétique disparu. Dans la colonne observations, nous avons noté par quels points de détails les expériences diffèrent entre elles.

D'après ces tableaux et cette figure, nous voyons donc qu'avec le bacille M en aérobiose :

1° Il faut la présence simultanée de glucose et d'acétylacétate pour observer une augmentation de l'acidité libérée.

TABLEAU II. — Les chiffres sont rapportés à 1 cent. cube d'émulsion.

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	DURÉE D'INCUBATION À 34° en heures	E _A		E _B		E _C		E _D		OBSERVATIONS								
		En centimètre cube	En 10 ⁻⁶ molécules	Acidité libérée	Glucose disparu	Acidité libérée	Acide acétyl acétique disparu	Acidité libérée	Glucose disparu		Acide acétyl acétique disparu							
1	4,30	0,432	5,9	0,451	6,7			0,176	7,8			0,965	43	2,96	16,4	2,44	23,9	0 c. c. 075 bicarbonate 5 p. 400 pour 1 c. c. 1 (culture sur moût de bière).
2	5	0,276	12	0,324	44,5	1	5,57	0,325	44,5	0,45	4,4	2,17	97	5,7	31,4	3,54	34,7	Concentration en glucose, 48 milligr. par cent. cube (culture sur moût de bière).
3	10	0,456	7	0,575	25,6	0,83	4,6	0,480	8	0,33	3,23	4,35	60,3	3,07	17,4	4,72	46,8	gr. 040 bacilles frais par cent. cube (culture sur bouillon de haricots).
4	5,45	0,44	19,6	0,51	22,7	4,34	7,4	0,48	21,4	1,5	14,7	2,93	131	7,52	44,8	4,76	46,6	(Culture sur moût de bière).

2° Dans ce cas, il disparaît cinq fois plus de glucose et d'acétylacétate que lorsque ces deux substrats sont seuls.

3° En première approximation, il disparaît simultanément 1 molécule d'acétylacétate et 1 molécule de glucose quand il apparaît 1 molécule d'acide β -hydroxybutyrique, 1 molécule d'acide lactique, 0,4 molécule d'acide acétique. Il y a libération de 2,4 molécules d'acide.

Mais ceci nous conduit à faire les remarques suivantes :

a) L'autolyse peut être un phénomène constant et se reproduire dans les émulsions E_A , E_B , E_C et E_D . Par contre, le glucose ou

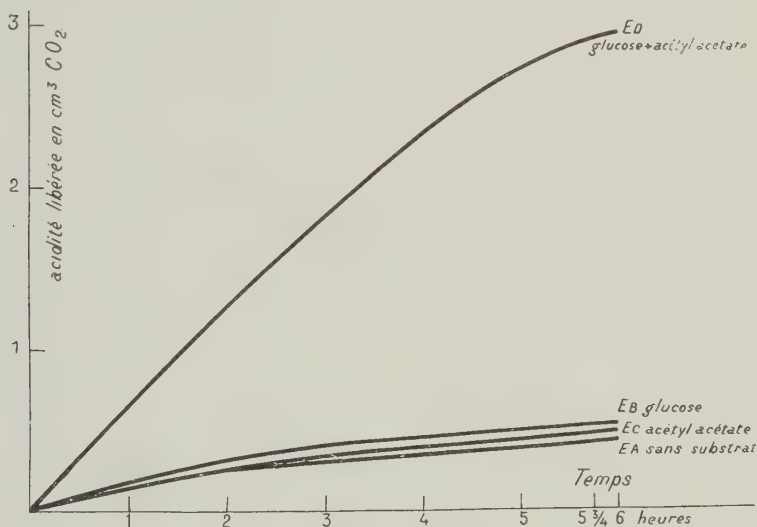


FIG. 4.

l'acétylacétate seuls doivent être métabolisés aux dépens des réserves intracellulaires alors que celles-ci restent intactes dans l'émulsion E_D . C'est ce que tendraient à montrer les mesures de diminution du poids sec des bactéries contenues dans 1 c. c. d'émulsion (tableau III).

On peut aussi penser que la diminution de masse de E_D due à l'action du glucose seul ou de l'acétylacétate seul, comme dans E_B et E_C , est compensée par une nouvelle formation de réserves ou une autolyse moins avancée.

b) On ne retrouve, en admettant qu'il se dégage 1 CO_2 par molécule d'acide acétique formé, que 34,8 μ Mol de glucose sous la forme d'acides acétique et lactique alors qu'on en compte 41,8 de disparu. La différence est de 7 Mol, soit 17 p. 100. Les quan-

TABLEAU III.

EXPÉRIENCE N° 3	DIMINUTION du poids sec des bacilles contenus dans 1 cent. cube en milligramme	POIDS SEC DES BACILLES dans 1 cent. cube en milligrammes	
		Avant incubation	Après incubation
E _A	0,32	4,26	3,94
E _B	0,46	4,55	4,09
E _C	0,56	4,58	4,02
E _D	0,34	4,76	4,42

tités mises en jeu sont encore du même ordre de grandeur que le poids sec de bacilles.

c) L'acidité libérée sans substrat ne correspond que pour une faible part à l'acide β -hydroxybutyrique durant ces premières heures d'autolyse, soit 24 p. 100, tandis que l'on sait d'après les résultats de Lemoigne que cet acide est presque le seul à se former si l'autolyse se poursuit pendant plusieurs jours.

En présence de glucose et d'acétylacétate, si l'on met à part l'acidité libérée par autolyse supposée la même que sans substrat, il reste 112,4 μ M. ; l'acide lactique + l'acide acétique + CO_2 correspondent à 86,4 μ M. Il reste une différence de 26 μ M., soit 23 p. 100.

Si l'on suppose que cette acidité est due au glucose que nous ne retrouvons pas, il faut supposer qu'à une molécule de ce glucose correspondent 3,7 fonctions acide. D'après les analyses de E_B, l'acide lactique formé doit l'être aux dépens de l'acidité libérée par autolyse.

d) Du point de vue du bilan des hydrogènes, la formation d'acide acétique supposé produit à partir de l'acide lactique correspond à la réduction de 33,4 μ M. d'acétylacétate. On ne voit pas encore à quoi est due la réduction du reste d'acétylacétate. Il est possible qu'il se forme un acide inconnu que nous n'avons pas encore identifié.

Toute cette discussion nous fait entrevoir la complexité d'un problème qu'il serait osé de vouloir résoudre du premier coup jusque dans ses moindres détails. Retenons seulement ces deux points essentiels :

1° L'acidité libérée par le bacille M ne peut être accrue que par la présence simultanée de glucose et d'acétylacétate.

2° L'oxydo-réduction glucose-acétylacétate produit de l'acide lactique.

MACRODOSAGE ET MICRODOSAGE DES AMINOPHÉNYLSULFAMIDES AU MOYEN DE L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE DE MEUNIER (*)

par F. NITTI et Y. JOYEUX.

Le dosage des sulfamides, basé sur la diazotation et la copulation de la fonction aminée libre, a été particulièrement étudié par Marshall (1). Nous avons suivi la technique de cet auteur, mais à la place du dichlorhydrate de la N- α -naphtyléthylène-diamine employée pour la copulation de l'azoïque, nous avons utilisé le monochlorhydrate de la N- α -naphtyl N'diéthyl-propylène-diamine préconisé par J. Tréfouël, ce corps étant d'une préparation plus aisée et donnant une coloration identique au précédent.

Nous n'insisterons pas sur la technique bien connue du dosage des différents sulfamides dans les liquides organiques.

La lecture des résultats a toujours été pratiquée à l'électrophotomètre de Meunier (écran vert, petite cuve).

L'étalonnage de l'appareil par des solutions de sulfamides diazotés et copulés nous a montré la proportionnalité absolue entre l'intensité de coloration et la compensation par le coin optique du photomètre ; en d'autres termes, les résultats s'inscrivent sur une droite. La sensibilité minima correspond à 0,05 mg. p. 100 c. c. et la maxima à environ 4 mg. p. 100 c. c. Il est évident que cet étalonnage doit être pratiqué pour chacun des différents sulfamides couramment employés (*p*-aminophénylsulfamide, sulfamidothiazol, sulfamidopyridine, etc.) [fig. 1].

Le coefficient d'erreurs pour le macrodosage, pratiqué sur 1 c. c. de sang par exemple, ne dépasse généralement pas 2 à 5 p. 100.

Lorsque les quantités de sulfamide sont trop élevées pour être dosées directement, nous préférons diluer le liquide organique à examiner ou l'azoïque copulé (dans l'eau additionnée d'acide trichloracétique) et nous évitons de nous servir des surcharges qui diminuent énormément la sensibilité du photomètre.

La possibilité d'estimer de très faibles écarts de coloration par l'électrophotomètre de Meunier, nous a permis de mettre au point un microdosage de sulfamide pratiqué sur de très faibles quan-

(*) Communication à la séance du 3 décembre 1942 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) E. K. MARSHALL, *J. Biol. Chem.*, 1937, **122**, 263.

tités de sang, de l'ordre de $1/40$ de centimètre cube. Cette méthode qui peut être également appliquée aux urines est particulièrement précieuse pour suivre l'élimination du sulfamide chez de petits animaux tels que la souris blanche.

La technique employée est la suivante :

On prélève à l'aide d'une pipette effilée et coudée une faible quantité de sang dans le sinus caverneux de la souris, par ponction au niveau de l'angle interne de la fente palpébrale. Le sang est rapidement rejeté sur une lame paraffinée. On prélève à l'aide d'une micro-pipette $1/40$ de centimètre cube de sang. On essuie rapidement l'extrémité de la pipette et on rejette le sang dans un tube contenant 4 c. c. d'eau.

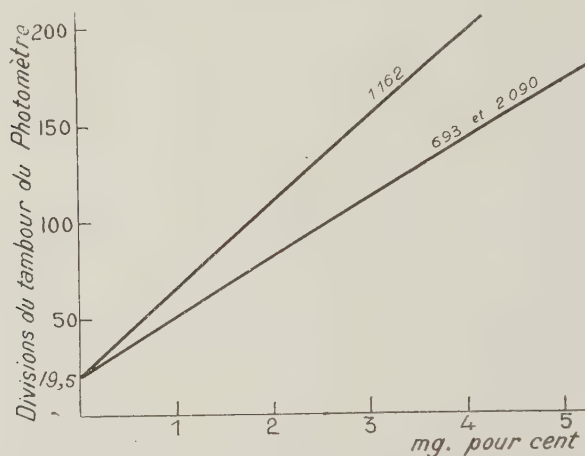


FIG. 1. — Courbe d'absorption au photomètre pour le 1162 F d'une part (courbe supérieure) et pour le 693 MB et le 2090 RP d'autre part (courbe inférieure).

On aspire et on rejette le liquide plusieurs fois pour laver complètement la pipette. Deux minutes après, la lyse du sang est complète. On ajoute à ce moment 1 c. c. d'acide chloracétique à 15 p. 100 ; on attend cinq minutes et on filtre sur un petit filtre sans cendres. On prélève 2,5 c. c. du filtrat et on l'additionne de 0,25 c. c. (V gouttes) de nitrite de soude à 0,1 p. 100. Après deux minutes, on ajoute V gouttes de sulfamate d'ammoniaque à 0,5 p. 100 et on agite. Deux minutes après on verse V gouttes de réactif IV. La lecture sera pratiquée dix minutes après.

Cette méthode permet d'apprécier des quantités de sulfamide relativement très faibles. Pratiquement on ne doit tenir compte que des taux excédant 1 mg. p. 100. Le coefficient d'erreur du microdosage ne dépasse pas 10 à 15 p. 100. Cette erreur est en réalité minime si l'on considère que la méthode nous permet de déceler et de doser des quantités de sulfamide de l'ordre de 0,24 γ (fig. 2).

Il est évident que de très grandes précautions doivent être prises au cours du microdosage. Les réactifs doivent être fraîchement préparés, notamment le nitrite de soude ; la verrerie parfaitement propre ; les tubes seront soumis à une ébullition alcaline, puis à un lavage acide et enfin à un rinçage pendant vingt-quatre heures dans l'eau courante.

La méthode de microdosage de sulfamide est particulièrement utile dans l'étude expérimentale de ces corps. Elle nous permet de suivre l'élimination chez la souris et d'étudier par exemple le moment de la concentration maxima dans le sang des différents sulfamides sur plusieurs souris en expérience. Il faut, en effet, considérer que la souris est surtout utilisée dans les essais de chimiothérapie antimicrobienne et qu'il est logique de rechercher chez elles les modalités d'élimination des corps chimiques étudiés. Citons, à titre d'exemple, le passage dans le sang de deux sulfamides : le *p*-aminophénylsulfamide et la sulfamidopyridine. Le premier, administré par la voie buccale, passe très rapidement dans le sang et le maximum de concentration est atteint trois quarts d'heure après l'ingestion. Douze heures après, la plus grande partie du médicament est éliminée et vingt-quatre heures après la totalité. La sulfamidopyridine s'élimine, par contre, d'une façon beaucoup plus lente et progressive, et vingt-quatre heures après on en retrouve encore des quantités importantes dans le sang (fig. 3 et fig. 4).

Nous savons que l'action de la sulfamidopyridine est nettement supérieure à celle de la *p*-aminophénylsulfamide dans les infections pneumococciques de la souris. Il est très vraisemblable que les modalités différentes d'élimination ne sont pas étrangères à cette différence d'activité. En effet, si au lieu d'administrer à la souris le *p*-aminophénylsulfamide en une seule fois, nous le mélangeons aux aliments, les résultats thérapeutiques dans l'infection pneumococcique seront meilleurs. L'élimination se fera ainsi

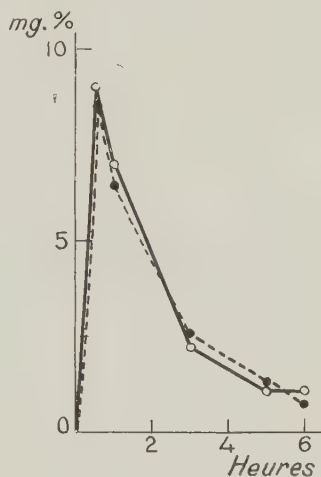


FIG. 2. — Élimination du 1162 F sur le cobaye. Expérience du 7 septembre 1942. Cobaye de 300 g. Dosage du produit dans le sang après ingestion de 0,200 g. par kilogramme. Courbe en trait interrompu (---) : résultats obtenus par macrodosage. Courbe en trait continu (—) : résultats obtenus par microdosage photométrique. Noter l'identité des deux courbes et le maximum de concentration dans le sang une demi-heure après l'ingestion.

d'une façon plus progressive et comparable à celle de la sulfamidopyridine.

En résumé, le microdosage de sulfamide ne présente pas de

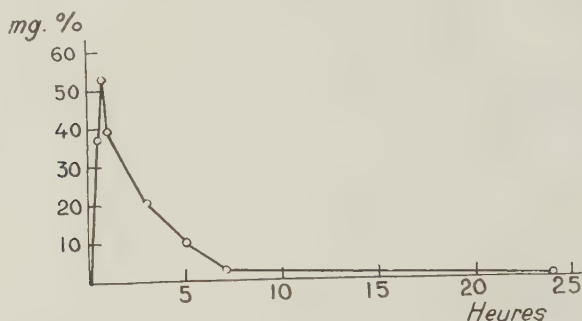


FIG. 3. — Élimination du 1462F sur la souris. Souris de 20 g. Dosage dans le sang après ingestion de 1 g. par kilogramme. Le produit est totalement éliminé en vingt-quatre heures.

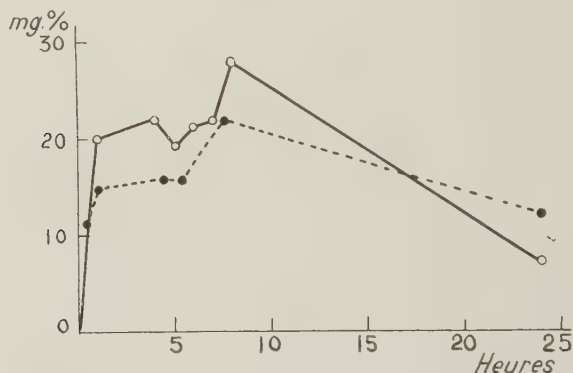


FIG. 4. — Élimination du 693 MB sur la souris. Dosage dans le sang après ingestion de 1 g. par kilogramme. Trait continu (—) : souris de 20 g., après quarante-huit heures on trouve encore 6,2 mg. p. 100. Trait interrompu (---) : souris de 17 g., après trente-deux heures on trouve encore 1,2 mg. p. 100; l'élimination est totale après quarante-huit heures.

grandes difficultés ; il permet d'expérimenter sur de très faibles quantités de produits biologiques et se montre de ce fait particulièrement précieux pour l'étude des éliminations chez les petits animaux tels que la souris.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 5 novembre 1942.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

INFLUENCE DE L'HUILE D'OLIVE NEUTRE SUR LE DÉVELOPPEMENT DES CULTURES DE BACILLES TUBERCULEUX AVIAIRES OU BOVINS SUR MILIEU DE LÆWENSTEIN

par P. GASTINEL, A. NEVOT et P. HEBRARD.

Au cours de travaux sur le bacille tuberculeux, dans le but de déterminer l'influence des cires et de leurs composants sur le développement des cultures sur milieu de Lœwenstein, nous avons été amenés à faire les constatations suivantes relatives à l'huile d'olive, neutralisée par le carbonate de soude, employée comme dissolvant des produits que nous nous proposons d'étudier.

Sur milieu de Lœwenstein, laissé incliné à l'étuve à 37°, auquel on a adjoint en surface, pendant quatre jours, de l'huile d'olive neutre, l'ensemencement de bacilles tuberculeux aviaires donne des cultures se développant avec retard par rapport à celles apparaissant sur Lœwenstein normal. C'est ainsi que sur ce milieu la culture se montre en nappe dès le cinquième jour, tandis qu'elle ne prend ce caractère que vers le douzième jour sur Lœwenstein baigné d'huile.

Des bacilles tuberculeux aviaires ou bovins, *en suspension huileuse*, laissés quatre à six jours à l'étuve à 37°, ensemencés sur milieu à l'œuf ne végètent plus. Un cobaye recevant sous la peau ces mêmes bacilles, meurt soixante-deux jours après une infection intercurrente et ne présente à l'autopsie aucune lésion tuberculeuse macroscopique.

Si les bacilles tuberculeux sont *émulsionnés en eau physiologique* avant d'être incorporés à l'huile, leur ensemencement, après le même séjour à l'étuve, donne naissance à des colonies qui apparaissent avec un retard de quelques jours seulement par rapport à celles d'un ensemencement normal, témoin : l'eau, non miscible au corps gras ayant protégé les microbes d'un contact intime avec l'huile bactéricide. Cette

action bactéricide de l'huile ne se produit que dans des conditions de durée et de température qui ressortent de nos expériences. C'est ainsi qu'une suspension huileuse riche en bacilles aviaires ou bovins ensemencée le jour même de sa préparation donne en un temps normal (six à huit jours) des cultures abondantes. Laisseée quinze jours à la température du laboratoire, en période d'hiver, cette même émulsion huileuse ne fournit plus de colonies nombreuses et confluentes qu'au bout de trois à quatre semaines.

Des bacilles tuberculeux aviaires ou bovins, en émulsion aqueuse, ensemencés sur milieu de Lœwenstein auquel on a incorporé de l'huile d'olive neutre : 0,5 c. c. par tube, poussent d'une façon toute particulière. Tandis que, six à huit jours après l'ensemencement, la culture a ses caractères normaux sur milieu ordinaire-témoin, elle est à peine visible sur Lœwenstein modifié. Et ce même aspect subsiste encore six mois après la mise en culture : les colonies restent « naines », en tapis « rasé » sur milieu auquel on a incorporé de l'huile d'olive neutre. Si l'huile d'olive utilisée n'est plus strictement neutre, mais de réaction acide, le milieu de Lœwenstein auquel on l'ajoute devient impropre à la culture des bacilles tuberculeux aviaires ou bovins.

Les aspects morphologiques et tinctoriaux des bacilles composant les colonies naines n'offrent aucune particularité ; ces colonies repiquées sur Lœwenstein ordinaire donnent des cultures classiques.

L'inoculation de bacilles de colonies naines à un cobaye le tue dans un délai de trente-deux jours. Eprouvé à l'intradermo-réaction à la tuberculine (1/10 de centimètre cube de tuberculine brute diluée au 1/10) le cobaye présente une réaction allergique très accusée ; à l'autopsie on trouve les lésions habituelles de la tuberculose chez le cobaye.

En résumé, dans nos expériences l'huile d'olive neutre a retardé ou modifié le développement des cultures de bacilles tuberculeux aviaires ou bovins suivant qu'elle a été mise à la surface du milieu de Lœwenstein ou incorporée à ce milieu. Agissant directement sur ces mêmes bacilles, après quatre à six jours de contact à 37°, elle a détruit leur pouvoir de multiplication sur Lœwenstein et pour le moins fortement diminué leur virulence pour le cobaye.

L'action bactéricide, *in vitro*, de certains corps gras, d'origine végétale ou animale, sur les microbes les plus divers : staphylocoque, paratyphique B, *Brucella*, bacille diphtérique... a déjà été signalée par plusieurs auteurs, notamment par Le Moignic et Pinoy (1), par P. Nélis (2), par E. Darzins (3). Ce dernier auteur a vu également l'action inhibitrice marquée de l'huile de pin, mise en surface du milieu de Lœwenstein, sur la croissance du bacille de Koch, mais nous n'avons pas connaissance qu'ait été mentionnée, *in vitro*, l'action bactéricide de l'huile d'olive neutre sur ce même bacille.

Nous n'avons pas trouvé non plus, dans la bibliographie consultée, de relations ayant trait aux colonies naines décrites dans la présente note.

Il est intéressant de rappeler que M. Nègre (4), traitant par ingestion

(1) LE MOIGNIC ET PINOY, *C. R. Soc. Biol.*, 1916, 79, 201.

(2) P. NÉLIS, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 1423 et 128, 28.

(3) E. DARZINS, ces *Annales*, 1938, 61, 172.

(4) L. NÈGRE, ces *Annales*, 1932, 49, 319.

ou injections répétées d'huile d'olive des cobayes et des lapins, a observé l'activité conférée ainsi aux lésions ; fait, en apparence du moins, opposé à nos constatations sur le rôle bactéricide de ce même produit sur les cultures de bacille de Koch sur milieu à l'œuf. Soulignant cette profonde différence des conclusions des expérimentations *in vivo* et *in vitro*, nous avons, en utilisant le lapin, obtenu des résultats comparables à ceux de M. Nègre dans des travaux que nous rapporterons ultérieurement.

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine.)

Séance du 3 décembre 1942.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

COMMUNICATIONS

TROIS CAS D'INFECTION OCULAIRE SPÉCIFIQUE AU COURS DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE PAR BACILLES ATTÉNUÉS

par J. BABLET et F. VAN DEINSE.

Les localisations oculaires au cours de la tuberculose expérimentale sont assez rares pour que nous croyions utile de décrire brièvement 3 cas de ce genre, rencontrés au cours d'un très grand nombre d'ino-culations expérimentales.

PREMIER CAS. — *Lapin 261*, est infecté, le 4 mars 1939, par voie veineuse, avec 2 mg. d'une culture « Bovine XIV », cinquantième passage sur pomme de terre biliée. Au début de novembre 1939 on voit se développer sur chaque œil une sorte d'excroissance, semblant prendre naissance au niveau de l'angle lacrymal, composée de tissu rose, granuleux, avec parties purulentes, laissant la pupille libre à gauche, la couvrant à droite. L'animal a en outre des tuméfactions aux pattes arrière et avant, mais semble bien portant par ailleurs. Un dosage d'urée, pratiqué le 14 décembre donne le chiffre de 0,56 par litre de sérum, normal chez le lapin. Comme les excroissances oculaires augmentaient lentement de volume, nous avons sacrifié ce lapin le 15 décembre 1939. A l'autopsie nous trouvâmes : une tuberculose articulaire aux quatre pattes, intéressant le métacarpe et le métatarse, et quelques points caséux sur le rein droit, en partie bosselé. Rate légèrement tuméfiée, poumons, foie et rein gauche normaux. L'examen histologique des yeux montre l'existence de nodules folliculaires caséux typiques, localisés sur l'iris, la cornée et la choroïde, contenant de très nombreux bacilles acido-résistants.

DEUXIÈME CAS. — *Cobaye 232*, inoculé le 26 novembre 1940, par voie sous-cutanée, avec 1 mg. de culture « Bovine XIV », quatre-vingt-huitième passage sur pomme de terre biliée. Au début de juillet 1942, donc plus de dix-neuf mois plus tard, on voit apparaître une ophtalmie froide de l'œil gauche, évoluant sans autre réaction de voisinage qu'un peu de blépharite. L'animal est sacrifié le 20 août 1942, vingt et un mois après l'inoculation, et, à part quelques ganglions inguinaux et sous-lombaires légèrement hypertrophiés, il ne présente aucun signe de tuberculose. L'examen histologique de l'œil révèle que toute la chambre postérieure et une partie de la chambre antérieure sont bourrées de polynucléaires avec bordure histiocytaire ; pas de follicules ; fonte du cristallin et nécrose des membranes. On trouve

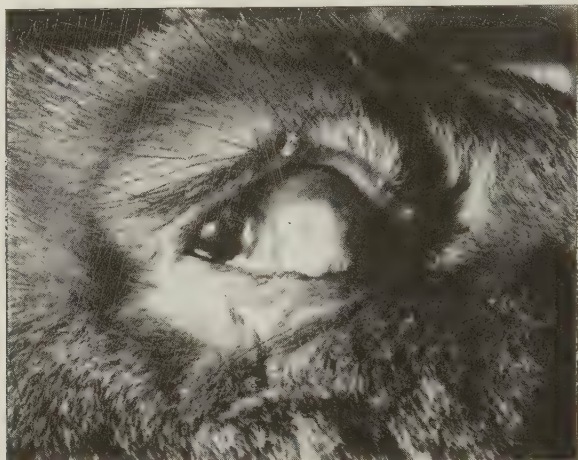


FIG. 1. — Lapin 261. Tuberculose oculaire par bacilles bovins atténués (50 passages sur bile).

quelques rares bacilles acido-résistants granuleux, faiblement colorés ; pas d'autres microbes.

TROISIÈME CAS. — *Cobaye 242*, inoculé le 7 octobre 1941, par voie médianale, avec 1 mg. de la culture « Gué » (humaine), cent trente-troisième passage sur pomme de terre biliée. Vers la fin de juillet 1942, plus de neuf mois après l'inoculation, on note l'existence d'une ophtalmie froide à droite, sans réaction de voisinage. L'animal est sacrifié le 20 août 1942. Pour toutes lésions on trouve quelques adhérences pleurales à gauche, et un léger épaississement du péricarde ; rien par ailleurs. L'examen histologique de l'œil droit montre les deux chambres comblées par des polynucléaires, avec bordure histiocytaire périphérique sans lymphocytes ni cellules géantes ; on voit quelques débris acido-résistants, pas d'autres microbes.

Ainsi donc, ces 3 cas concernent des animaux inoculés avec des souches de bacilles tuberculeux biliés. Seul le premier a donné lieu à des formations tuberculeuses typiques, la culture en question n'ayant pas encore subi, probablement, un nombre suffisant de passages sur

la pomme de terre biliée pour avoir perdu toute sa virulence. Les deux autres, vu leur caractère clinique et l'absence d'autres microbes, doivent être considérés, à notre avis, comme étant de nature tuberculeuse, malgré l'aspect atypique banal des images histologiques qui se rapprochent de celles décrites par l'un de nous dans un travail antérieur sur les modifications de la virulence du bacille tuberculeux au cours des passages successifs sur pomme de terre biliée (1).

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DU BOTULISME

par R. LEGROUX et C. JÉRAMEC.

Lors d'une intoxication botulique, il est d'un grand intérêt thérapeutique de pratiquer des recherches bactériologiques à partir de l'aliment suspect. Nous exposerons les deux techniques, utilisées par nous depuis plusieurs années, qui nous permettent d'isoler et d'identifier rapidement le germe pathogène.

Il s'agit, en effet, d'une part, d'obtenir la culture anaérobie de la bactérie et, d'autre part, de donner au médecin traitant l'indication du type de bacille botulique en cause, type A ou type B : ces deux types sont les seuls qui aient été isolés, avec certitude, à l'origine des intoxications humaines.

Nous avons depuis plusieurs années préparé les anatoxines A et B (1) grâce auxquelles G. Ramon a pu produire les sérums antitoxiques correspondants.

Tous les aliments que nous avons examinés depuis plus de quinze années étaient infectés par le type B (2), ce qui n'a fait que confirmer la notion que le type A est exceptionnel en Europe alors que sur d'autres continents, aux Etats-Unis entre autres, il se rencontre assez fréquemment (3).

Le prélèvement bactériologique se fera de différentes manières suivant l'état physique de l'aliment : s'il s'agit d'un solide baignant dans du liquide, petits pois, haricots verts, viandes en sauce, on prélève et du liquide et une partie solide ; s'il s'agit d'une chair musculaire saumurée salée, d'un pâté, on recherche au niveau des points qui semblent altérés dans leur texture et leur couleur. L'odeur des aliments botuligènes n'est pas putride.

Nous faisons une préparation microscopique des différentes parties (coloration Gram-fuchsine) et recherchons la présence de bacilles sporulés ou de spores ovoïdes qui peuvent faire soupçonner le bacille botulique ; assez souvent on trouve les spores en grande abondance accompagnant d'autres bactéries, *B. cretici*, streptocoques lactiques dans les

(1) F. VAN DEINSE, ces *Annales*, 1941, **66**, 191 et 1942, **68**, 271.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 641.

(3) *C. R. Ac. Méd.*, 1942, **126**, 372.

(3) *Rev. Immunol.*, 1936, **2**, 209.

viandes saumurées. La partie sporifère est ajoutée à quelques centimètres cubes d'eau physiologique qui sont mis en ampoules, que l'on scelle avant de les placer au bain-marie à 70° durant une demi-heure.

Ce liquide est alors ensemencé en gélose-gélatine profonde. Nous insistons à nouveau sur l'emploi de ce milieu particulier qui permet pour la recherche d'anaérobies, comme d'aérobies, un isolement rapide par suite de sa composition et de sa lecture facile ; nous l'utilisons depuis plus de douze années.

Dès la quinzième heure à 35°, de très petites colonies apparaissent à 20 mm. de la surface aérée du milieu, en même temps que dans la profondeur. Vers la dix-huitième heure, ces colonies deviennent plus visibles parce qu'elles s'entourent de fins rayons sur toute leur surface, enfin après vingt à vingt-quatre heures, les colonies acquièrent un volume de 2 mm. de diamètre, sont blanches, houppeuses en forme de tampon d'ouate.

Si l'examen microscopique des colonies montre un bacille morphologiquement semblable au bacille botulique, nous ensemençons en bouillon glucosé, à 2 p. 100, mis dans un tube à bille d'Yvan Hall, capuchonné au caoutchouc ; il nous paraît indispensable de glucoser ce milieu, car en bouillon simple on risque de n'obtenir aucun développement du bacille lors de ce premier ensemencement ; le développement s'observe rapide, abondant, avec dégagement de nombreuses bulles de gaz, dégagement qui se ralentit puis s'arrête après quarante-huit heures. Nous avons l'habitude de maintenir cette culture en milieu liquide sept jours à 35°, puis nous filtrons le bouillon à travers une bougie L₃ ; le filtrat est inoculé sous la peau d'un cobaye à une dose très forte, 1/10 de centimètre cube, parfois plusieurs centimètres cubes en cas d'insuccès de la première inoculation.

L'activité mortelle des toxines botuliques ainsi isolées semble sous la dépendance de l'aliment où le bacille s'est primitivement développé. Voici à titre d'exemple les doses mortelles du premier filtrat des cultures que nous avons étudiées ces temps derniers :

Jambon de Bayonne	Dose mortelle 1/10 de centimètre cube.
Jambon d'Oise	Le filtrat n'a pas tué le cobaye.
Epinards	Dose mortelle 1/1.000 de centimètre cube.
Haricots verts	Dose mortelle 1/100 de centimètre cube
Petits pois	Dose mortelle 1/500.000 de centimètre cube.
Graisse de confit d'oie	Dose mortelle 4 c. c.
Jambon d'Amiens	Le filtrat n'a pas tué le cobaye.

Le pouvoir toxigène du bacille botulique, comme celui des autres bactéries, est lié à la composition des milieux de culture ; nous en avons eu une nouvelle démonstration, expérimentale, lors de l'isolement du bacille botulique de la graisse de confit d'oie : alors que le filtrat du premier bouillon glucosé n'a tué qu'à la dose de 4 c. c., cette souche, cultivée en un *terrain* différent, dans un milieu de culture constitué par des petits pois stérilisés, amène la mort du cobaye à une dilution de 1/1.000.

En possession du filtrat toxique nous pouvons identifier le type du germe par la neutralisation de sa toxine au moyen des antitoxines spécifiques.

Toutes ces recherches, bactériologiques, faites au départ de produits

suspects demandent plus d'une semaine pour aboutir à l'identification du type. S'il est intéressant de confirmer, au laboratoire, le diagnostic clinique, il est urgent d'indiquer dans le plus bref délai quel sérum thérapeutique doit être utilisé, du type A ou du type B, étant donnée l'activité relativement stricte de chaque antitoxine (4).

Voici le procédé qui nous permet de donner une réponse rapide au clinicien. Après que l'examen microscopique nous a précisé la présence de formes bactériennes semblables au bacille botulique dans l'aliment incriminé, nous mélangeons la fraction repérée de cet aliment, non chauffée afin de ne pas la priver de la toxine, d'une part avec 1 c. c. de sérum antibotulique A, d'autre part avec 1 c. c. de sérum antibotulique B ; nous inoculons chacune des deux préparations à un cobaye. Moins de quinze à dix-huit heures après cette inoculation, l'un des cobayes est mort ou très malade, il n'y a donc pas eu de neutralisation de la toxine par le sérum injecté à cet animal ; le second cobaye survit, il a donc reçu le sérum capable de neutraliser la toxine en cause ; parfois, si la toxicité du produit est grande, le second animal présente un botulisme chronique : aphonie, amaigrissement considérable, paralysie des muscles abdominaux et il meurt, émacié, entre le sixième et le douzième jour ; la dose de sérum était insuffisante.

Ce procédé, rapide, simple et sûr, permet de prescrire sans tarder le sérum spécifique correspondant au type du microbe pathogène.

(Institut Pasteur.)

NOUVEAUX ÉLÉMENTS DE RAPPROCHEMENT DES BACILLES DE LA MORVE DE WHITMORE ET PYOCYANIQUE

par R. LEGROUX et G. BLANC.

Nous avons signalé dans une note présentée à la séance précédente (1) que le sérum d'un animal préparé par des injections de bacille de Whitmore pouvait agglutiner aussi, et très fortement, certaines souches de bacille pyocyannique alors qu'il n'avait aucune action sur d'autres souches du même microbe. Ces expériences ayant été faites sur des souches récemment isolées au Maroc, il nous a paru nécessaire, pour préciser l'importance des premiers résultats obtenus, de les vérifier sur d'autres souches. Nous avons choisi celles de la collection du service de Microbie technique de l'Institut Pasteur. Les agglutinations ont été recherchées avec le même sérum antiwhitmore, préparé sur mouton, qui avait servi aux expériences précédentes. La petite quantité existante de ce sérum, et la difficulté actuelle de nous en procurer d'autre, nous a permis seulement de faire un premier travail d'ensemble sans pouvoir approfondir ces recherches, et en particulier de vérifier si le passage des souches parisiennes de bacille pyocyannique

(4) *Rev. Immunol.*, 1936, 2, 219.

(1) G. BLANC, B. DELAGE et L.-A. MARTIN, *Association Microbiologistes Langue Française*, séance du 1^{er} octobre 1942.

par cobayes renforçait leur agglutinabilité comme nous l'avions observé avec la souche marocaine Fl. H.

Tels que nous les avons observés, nos résultats d'aujourd'hui confirment que des souches de bacille pyocyannique sont agglutinées par le sérum antiwhitmore, alors que d'autres ne le sont pas. Sur 31 souches de la collection de l'Institut Pasteur, 21 ne sont pas agglutinées, les autres le sont par une faible dilution du sérum, 1 p. 50. Parmi les

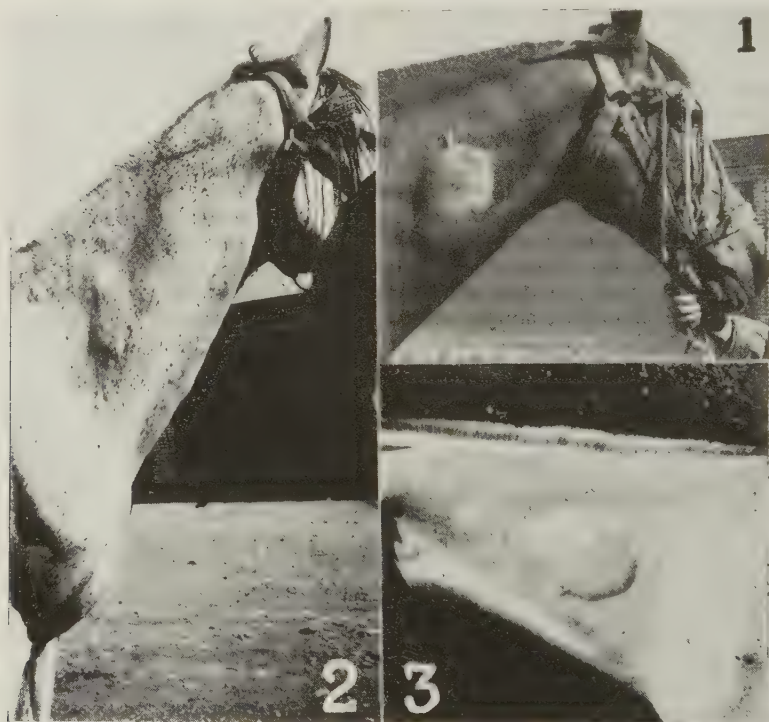


FIG. 1. — Réaction de chevaux morveux vingt-quatre heures après l'injection sous-cutanée des trois antigènes : 1° antigène Whitmore; 2° antigène pyocyannique; 3° antigène morve.

souches agglutinées, 2 ont été isolées de cerveaux de souris (souches 6.037 et 6.038 Lépine), 2 sont isolées de suppurations humaines (souches Garches et Rouen), 6 sont des souches provenant de C. Gesard et entretenues au laboratoire depuis près de cinquante années.

Ces résultats confirment et élargissent les données que nous avons précédemment établies, ils montrent que l'agglutinabilité par le sérum antiwhitmore est commune au bacille de Whitmore et à de nombreuses souches de bacilles pyocyaniques constituant un caractère de groupe entre ces deux germes que nous avons rapprochés jadis (2 et 3).

(2) R. LEGROUX, ces *Annales*, 1927, **41**, 1248.

(3) R. LEGROUX et J. GENEVRAY, ces *Annales*, 1933, **51**, 249.

Il nous a paru intéressant de rechercher alors comment se comportait le bacille de la morve en présence de notre sérum antiwhitmore. Des expériences antérieures faites par l'un de nous en collaboration avec Kemal-Djemil (4) avaient déjà montré l'existence de caractères de groupe entre les bacilles pyocyanique, de Whitmore et de la morve, caractères tirés des propriétés lytiques du filtrat des cultures de ces trois germes, en particulier de l'action lytique du filtrat de culture du bacille de Whitmore sur le bacille pyocyanique et le bacille de la morve : le filtrat de la culture en bouillon de bacille de Whitmore entraîne la lyse transmissible en série des cultures de bacille pyocyanique et de bacille de la morve.

Nos expériences actuelles d'agglutination nous permettent d'apporter un nouveau caractère de groupe entre les trois bactéries, car le sérum antiwhitmore se montre très agglutinant pour les bacilles de la morve.

Sur 10 souches de la collection de l'Institut Pasteur que nous avons éprouvées, 8 sont fortement agglutinées : 2 à une dilution de 1 p. 1.000, 2 à une dilution de 1 p. 500, 4 avec la dilution à 1 p. 100 ; ces agglutinations sont observées macroscopiquement sur une concentration bactérienne voisine de 2 milliards au centimètre cube. Ces souches de bacilles de la morve proviennent soit de malades humains (souches K 1, K 2 et T), soit de malades équins (souche A très ancienne isolée par Nocard, souches Césari, Rinjard et 2 souches rapportées d'Iran isolées d'abcès cutané et du poumon).

En résumé, un sérum agglutinant préparé avec une souche de bacille de Whitmore agglutine un certain nombre de souches de bacille pyocyanique de provenances diverses et un grand nombre de souches de bacille morveux, ce qui nous apporte un nouveau caractère de groupe qui confirme la parenté de ces trois germes.

Rappelons en terminant les caractères communs actuellement établis par nous, qui autorisent le groupement de ces trois bactéries :

I. Les caractères biochimiques *in vitro* du bacille de Whitmore et du bacille pyocyanique sont très voisins (3).

II. Entraînement de la lyse transmissible du bacille de la morve par les filtrats de cultures âgées de bacille pyocyanique ou de bacille de Whitmore ; ce principe lytique est spécifique, il n'est actif que sur les trois germes (4).

III. Pouvoir pathogène expérimental des trois germes : l'inoculation dermique, sous-cutanée ou intrapéritonéale au cobaye provoque des lésions identiques.

IV. Pouvoir curatif d'un sérum antimorveux sur l'infection expérimentale du cobaye par le bacille de Whitmore comme sur l'infection naturelle de la morve chez les Equidés (5).

V. Action agglutinante d'un sérum antiwhitmore, expérimental, comparable vis-à-vis des bacilles pyocyanique, de Whitmore et de la morve.

VI. Action d'hypersensibilité spécifique exactement semblable des trois antigènes (principe lytique formolé), morve, Whitmore et pyocyanique, chez les chevaux morveux (6) [fig. 1].

(4) R. LEGROUX et KEMAL-DJEMIL, *C. R. Ac. Sci.*, 1931, **193**, 117.

(5) R. LEGROUX, *C. R. Ac. Sci.*, 1936, **203**, 345.

(6) R. LEGROUX, Travail inédit de 1936.

VII. Comportement chez les Arthropodes : le bacille de Whitmore et le bacille pyocyanique évoluent de façon entièrement superposable chez la puce du rat (*X. cheopis*) ; des recherches en cours nous montreront le comportement du bacille de la morve chez cet arthropode (7).

**SENSIBILITÉ DES BACILLES PESTEUX
ET PSEUDOTUBERCULEUX D'UNE PART
DES GERMES DU GROUPE COLI-DYSENTÉRIQUE
D'AUTRE PART
AUX BACTÉRIOPHAGES HOMOLOGUES**

par G. GIRARD.

Dans une récente communication (1) nous rapportions que les bactériophages des bacilles pesteux et pseudo-tuberculeux étaient sans action sur les *Pasteurella*, ce qui constituait pour nous un nouveau caractère tendant à séparer les bacilles de Yersin et de Malassez du groupe *Pasteurella* dans lequel ils sont communément intégrés.

A ce propos, M. Wollman attirait notre attention sur des constatations faites par P. C. Flu, en 1928 (2) : cet auteur expérimentant sur plusieurs échantillons de bactériophages isolés de l'eau des canaux de la ville de Leyde, en dehors de toute manifestation de peste humaine, s'aperçut qu'ils lysaient à la fois et le bacille pesteux et les germes du groupe coli-dysentérique ; puis, tandis que l'action sur D (3) s'atténuait pour ces phages chauffés une heure à 56° ou conservés un certain temps à la température du laboratoire, leur pouvoir lytique se maintenait élevé à l'égard de P. et il suffisait de quelques passages sur P. pour leur faire récupérer leur activité initiale vis-à-vis de D. Etant donné ce que l'on sait de l'action des bactériophages, n'y avait-il pas dans ce phénomène une indication sur une parenté possible entre le bacille pesteux et les germes du groupe coli-dysentérique ? Telle était la suggestion formulée par M. Wollman.

Nous nous souvenions alors qu'à Tananarive, il y a une dizaine d'années, nous avions incidemment avec J. Robic ajouté à une culture en bouillon de P. quelques gouttes d'un phage commercial polyvalent, actif en principe sur les germes des infections intestinales, et nous avions été assez surpris de noter un éclaircissement passager de la culture. Nous n'avons pas poussé la recherche plus à fond et pensions avoir mis en évidence un principe lytique du groupe D, la pseudo-tuberculose des rongeurs n'étant par rare en France et son microbe se comportant au point de vue de la lyse comme le bacille pesteux.

(7) G. BLANC et M. BALTAZARD, *C. R. Ac. Sci.*, 1941, **213**, 541 ; ces *Annales*, 1942, **68**, 281 ; *C. R. Ac. Sci.* (sous presse).

(1) G. GIRARD, *Ass. Mic. L. Franç.*, ces *Annales*, 1942, **68**, 476.

(2) P. C. FLU, *Zentralbl. Bakt. I.*, 1929, **113**, 284.

(3) Pour éviter des répétitions, nous désignons par D les bacilles dysentériques et par P le bacille pesteux.

Aussi, sur le conseil de M. Wollman qui voulut bien mettre à notre disposition deux des bactériophages que Flu lui avait adressés et qui étaient gardés en glacière depuis six ans, avons-nous reproduit les expériences du savant hollandais et confirmé ses premières constatations sur les phages A et C qui se montrèrent d'emblée actifs sur P. et ne lysèrent la souche D Y 6r qu'après 4 passages sur P. Ces essais ne furent exécutés que sur des cultures en bouillon. S'il n'y eut jamais de culture secondaire avec P. comme c'est la règle avec tous les phages doués d'une certaine activité sur ce germe, ces cultures apparurent constamment avec D. Un résultat semblable fut obtenu avec un autre échantillon D (Shiga 4).

Nous avons ensuite effectué les mêmes recherches sur deux bactériophages considérés alors comme spécifiques du bacille pesteux et dont nous entretenons l'activité depuis dix ans par des passages réguliers uniquement sur P. qu'ils lysent totalement en bouillon à la dilution de 10^{-8} . Ils ont été isolés, l'un au Sénégal par Couvy, l'autre (constitué lui-même d'un mélange de 3 souches) par nous-même, au cours d'épidémies de peste, sur l'homme, le rat, la *Xenopsylla cheopis*. Ils ont lysé au premier passage et sans culture secondaire la souche D Y 6r. Un autre échantillon de phage du bacille pesteux (souche Advier, origine Sénégal), maintenu depuis 1932 en tube scellé sans aucun passage avait perdu une partie de son activité sur P., car le tube de bouillon additionné de V gouttes de phage pur donnait une culture secondaire vingt-quatre heures après son éclaircissement ; or, avec cet échantillon le D. Y 6r ne fut pas lysé d'emblée, mais seulement après un passage par P.

Il apparaît donc que les bactériophages pesteux désignés comme tels du fait des circonstances qui ont entouré leur isolement sont actifs sur des germes du groupe coli-D. Inversement, certains bactériophages étiquetés dysentériques, tel le phage C. 16 de Burnet qui ne fut jamais passé que sur D., sont actifs sur P. comme nous avons pu nous en assurer auprès de M. Wollman. Ajoutons que ce qui vient d'être dit du bacille pesteux et de son bactériophage s'applique intégralement au bacille pseudo-tuberculeux et au bactériophage correspondant.

Quelle interprétation doit-on donner à ces faits ?

On pourrait alléguer que les phages étudiés contenaient à l'origine deux principes distincts et indépendants, l'un actif sur P., l'autre sur D. Mais si l'hypothèse semble fondée en ce qui concerne les phages de Flu qui ont été conservés sans repiquage pendant plusieurs années, elle n'est plus soutenable avec nos phages de Madagascar ; en effet, ceux-ci ont été une fois par an depuis environ dix ans passés sur P. seul pour la préparation d'importantes quantités de phage employé à titre expérimental ou thérapeutique. La dilution du principe lytique spécifique de D., s'il s'en était trouvé un à l'origine, serait aujourd'hui tellement élevée (autour de 10^{-25} d'après un rapide calcul) qu'il ne saurait être retrouvé. Nous sommes donc conduit à admettre que nous avons affaire à un seul phage actif sur les deux espèces P. et D. ou à deux phages dont l'activité s'exerce d'une manière réciproque sur ces mêmes germes. C'est l'opinion à laquelle s'arrête M. Wollman et à laquelle nous nous rallions.

Le phénomène ci-dessus décrit suffit-il à justifier dans la classification un rapprochement entre le bacille pesteux (ainsi que le bacille pseudo-tuberculeux) et les germes du groupe coli-D ? C'est, croyons-nous, la première fois que la question se pose de prendre en considération la sensibilité à un même facteur lysogène de deux microbes qu'aucun lien antigénique ne relie par ailleurs pour chercher à établir entre eux une certaine parenté. Nous avons vérifié que DY 6r si sensible à la lyse avec nos phages du bacille pesteux ne possédait pas apparemment de caractère antigénique commun avec ce dernier : absence totale de floculation avec les filtrats de culture en bouillon additionnés de sérum antipesteux, absence d'agglutination, pas la plus légère trace d'immunité à l'égard de la peste chez les cobayes qui reçurent sous la peau de fortes doses de ce D. vivant. Au surplus, on sait que dans un même groupe des germes sont sensibles à la lyse et d'autres ne le sont pas, ce qui n'empêche que tous restent classés au sein du groupe par un ensemble de propriétés communes.

En rapportant simplement ici un phénomène pour le moins curieux et assez inattendu, nous ne croyons pas être autorisé à en tirer quelque déduction à l'appui ou à l'encontre de la suggestion exprimée par M. Wollman.

Disons en terminant que si on ne peut plus invoquer la spécificité du bactériophage P., cela ne réduit pratiquement pas la valeur de la réaction qui consiste à additionner ce phage à une culture en bouillon pour l'identification du bacille de Yersin, car l'aspect de la culture témoin en bouillon de bacille D. est par lui-même assez caractéristique pour empêcher toute confusion avec le tube témoin de culture de peste.

(Institut Pasteur. Service de la Peste.)

M. G. Blanc : Je partage entièrement l'opinion de M. Girard que le bacille de la peste ne doit pas être rangé dans le groupe des *Pasteurella* : non seulement le principe lytique du bacille pesteux n'est pas transmissible aux *Pasteurella*, mais les *Pasteurella* se comportent chez la puce du rat *X. cheopis*, tout autrement que le bacille pesteux : alors que ce dernier, comme l'on sait, se conserve et se multiplie chez la puce, les *Pasteurella* sont détruites en moins de vingt-quatre heures (expériences inédites).

INFLUENCE DE L'ACIDE ASCORBIQUE SUR LA CULTURE DE *SP. GALLINARUM*

par M. LWOFF et V. CHORINE.

(Paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.)

ÉVALUATION PAR IRRADIATION ALPHA DES DIMENSIONS DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

par P. BONÉT-MAURY.

(Paraît en *Mémoire* dans ce n° des *Annales de l'Institut Pasteur*.)

**SUR UNE CAUSE IMPORTANTE D'ERREUR
DANS LE TITRAGE DES BACTÉRIOPHAGES
CAS DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES
NON HOMOGÈNES**

par P. NICOLLE.

(Paraît en *Mémoire* dans ce n° des *Annales de l'Institut Pasteur*.)

**MACRODOSAGE
ET MICRODOSAGE DES AMINOPHÉNYLSULFAMIDES
AU MOYEN DE L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE DE MEUNIER**

par F. NITTI et Y. JOYEUX.

(Paraît en *Mémoire* dans ce n° des *Annales de l'Institut Pasteur*.)

Séance du 7 janvier 1943.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

COMMUNICATIONS

**« SUBSTANCES ANTIHISTAMINIQUES »
ET RÉACTIONS TUBERCULINIQUES**

par A. BOQUET.

A la lumière des travaux de Th. Lewis (1) et de A. Krogh (2), il était naturel de penser que les dermo-réactions tuberculiniques, comme les réactions urticariennes, traduisent les effets de substances histaminiques (substance H de Lewis) sur les tissus rendus hypersensibles par l'infection bacillaire. C'est cette opinion que nous avons émise

(1) Th. LEWIS, *Blood vessels of the human skin and their responses*, Londres, 1927.

(2) A. KROGH, *Anatomy and physiology of capillaries*, 2^e édit., New-Haven, 1929.

en 1931 (3), en précisant que ces substances devaient être libérées par les éléments cellulaires locaux et non à partir de la tuberculine injectée.

Les études de D. Bovet et de A. M. Staub (4 et 5) sur les propriétés antihistaminiques de divers produits synthétiques, les recherches plus récentes de B. Halpern (6) sur le même sujet, les expériences de Pasteur Valléry-Radot, D. Bovet, G. Mauric et A. Holtzer (7), et les résultats obtenus par plusieurs auteurs (8) dans le traitement de divers syndromes allergiques nous ont ainsi conduit à vérifier dans quelle mesure et sous quelle forme ces produits sont susceptibles d'influencer les réactions tuberculiniques locales et générales chez le cobaye tuberculeux.

Nos essais ont porté sur la thymoxyéthyl-diéthylamine ou 929 F, 3 diéthylaminoéthylbenzodioxan ou 883 F et sur le chlorhydrate de la N-diméthylaminoéthyl-N-benzylamine ou 2.339 R P que notre collègue M. Bovet a aimablement mis à notre disposition.

929 F.

A. *Action sur l'épreuve de toxicité.* — a) Injection sous-cutanée de 10 mg. de 929 F à 7 cobayes tuberculeux (de 350 à 450 g.) et, cinq minutes plus tard, injection sous-cutanée d'une dose mortelle et demie de tuberculine brute. Tous les animaux meurent d'intoxication tuberculinique entre la sixième et la huitième heure.

b) Deux cobayes tuberculeux pesant 520 et 555 g. ont successivement reçu 20 mg. de 929 F et une dose mortelle et demie de tuberculine brute sous la peau ; deux heures plus tard on leur a fait une nouvelle injection de 30 mg. de 929 F. Un est mort en moins de trois heures d'intoxication médicamenteuse, semble-t-il, l'autre a succombé en moins de dix-huit heures avec les signes habituels de l'intoxication tuberculinique.

B. *Action sur l'intradermo-réaction.* — Même préparation qu'en b (20 mg. + 30 mg. de 929 F). Intradermo-tuberculation à la dose de 1 c.g. de tuberculine brute (0,1 c. c. de la solution au 1/10) aussitôt après la première injection : réaction nécrotique très forte.

883 F.

A. *Action sur l'épreuve de toxicité.* — Deux injections sous-cutanées de 10 mg. et 20 mg. de 883 F (cobayes tuberculeux de 350 à 450 g.) à une heure et demie d'intervalle. Quinze minutes après la première, on injecte sous la peau 0,4 c. c. de tuberculine brute (un peu plus d'une dose mortelle). Deux cobayes sont morts d'intoxication tuberculinique en moins de dix-huit heures. Les deux survivants ont reçu de nouveau, deux jours après la première injection, 0,5 c. c. de tuberculine brute ; ils sont morts en moins de dix-huit heures d'intoxication tuberculinique.

(3) A. BOQUET, *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 109.

(4) D. BOVET et A. M. STAUB, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 547.

(5) A. M. STAUB, ces *Annales*, 1939, **63**, 400 et 485.

(6) B. M. HALPERN, *J. Médec. de Lyon*, 20 juillet 1942, 409.

(7) PASTEUR VALLÉRY-RADOT, D. BOVET, G. MAURIC et A. HOLTZER, *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 354, 385, 453.

(8) En particulier P. DECOURT, *Bull. Soc. Médic. Hôpit. de Paris*, 1942, **58**, 265. — J. CELICE, M. PERRAULT et P. DUREL, *Bull. Soc. Médic. Hôpit. de Paris*, 1942, **58**, 284.

B. *Action sur l'intradermo-réaction.* — a) Une seule injection sous-cutanée de 883 F, à raison de 5 mg. par 100 g. d'animal (6 cobayes tuberculeux). Immédiatement après, intradermo-tuberculation (1 g. de tuberculine brute) : *réactions œdémateuses ou nécrotiques*. Les intradermo-tuberculations de contrôle faites six jours après la première ont donné 4 réactions de même intensité et 2 un peu plus fortes.

b) Injection sous-cutanée de 20 à 25 mg. de 883 F (5 mg. par 100 g.) à 4 cobayes tuberculeux ; ensuite intradermo-tuberculation comme précédemment, et, cinq heures et demie après, nouvelle injection de 10 mg. de 883 F : *réactions œdémateuses ou hémorragiques*. A l'intradermo-tuberculation de contrôle, faite six jours plus tard, une seule réaction a été un peu plus forte que les premières.

2339 RP.

A. *Action sur l'épreuve de toxicité.* — Un cobaye tuberculeux reçoit sous la peau 6 mg. de 2339 RP par 100 g. (9) et, cinq minutes plus tard, trois doses mortelles de tuberculine brute. Cinq heures et demie après on lui injecte de nouveau 4 mg. par 100 g. de 2339 RP. Il meurt en moins de douze heures d'intoxication tuberculinique.

Deux cobayes tuberculeux reçoivent sous la peau 5 mg. de 2339 F par 100 g., puis on injecte à l'un, sous la peau, trois doses mortelles et à l'autre une dose mortelle et demie de tuberculine brute. Tous deux meurent en moins de douze heures d'intoxication tuberculinique.

B. *Action sur l'intradermo-réaction.* — a) Une injection sous-cutanée de 2339 RP, à raison de 5 mg. par 100 g. d'animal. Cinq minutes après, intradermo-tuberculation (1 cg. de tuberculine brute). Les 3 cobayes tuberculeux ainsi traités ont présenté de *belles papules*, identiques, en intensité, aux papules produites cinq jours plus tard par l'intradermo-tuberculation de contrôle.

b) Une injection sous-cutanée de 2339 RP, à raison de 5 mg. par 100 g. d'animal puis, aussitôt après, intradermo-tuberculation comme précédemment. Cinq heures et demie plus tard, deuxième injection de 10 mg. au total de 2339 RP. Les 6 cobayes tuberculeux ainsi traités ont réagi par des *papules normales, œdémateuses ou hémorragiques*.

c) Huit cobayes tuberculeux pesant 400 à 450 g. reçoivent sous la peau 20 mg. de 2339 RP, puis, de chaque côté, dans la région du flanc et de la côte, 4 piqûres intradermiques de tuberculine à doses décroissantes, correspondant à 1/1.000, 1/5.000, 1/10.000, 1/25.000 de centimètre cube de tuberculine brute sous le même volume de 0,1 c. c. Cinq heures et demie plus tard, on leur injecte de nouveau 15 mg. de 2339 RP. Tous ont réagi dans les délais habituels par des papules œdémateuses, petites pour les doses faibles, du diamètre d'une pièce de 0 fr. 50 ou de 1 franc pour les doses les plus fortes. Des intradermo-réactions de contrôle, faites aux

(9) Le 2339 RP donne une suspension louche dans l'eau physiologique, mais il se dissout facilement dans l'eau distillée légèrement chauffée. Les solutions que nous avons employées en contenaient 10 à 20 mg. par centimètre cube. L'injection du produit ainsi dissous provoque une forte réaction inflammatoire locale. Lorsque la dose injectée est égale ou supérieure à 6 mg. par 100 g. d'animal, les cobayes présentent au bout de quelques minutes les signes d'une très vive agitation, du machonnement, de l'exophthalmie, une respiration accélérée et discordante ; ils tombent sur le côté et sont agités par des mouvements convulsifs et des secousses musculaires. Si la dose n'est pas trop élevée, ces troubles se dissipent assez rapidement.

mêmes doses six jours plus tard, ont donné des résultats assez comparables ; cependant 3 cobayes dont le tissu sous-cutané abdominal était particulièrement infiltré ont alors réagi plus faiblement (10).

Bien qu'ils puissent être considérés comme peu probants dans l'ensemble, sinon comme pratiquement négatifs, les résultats de ces expériences ne semblent pas devoir infirmer l'hypothèse de la nature histaminique des substances qui interviennent dans les réactions tuberculiniques. En ce qui concerne plus particulièrement les dermo-réactions, il convient, en effet, de retenir cette circonstance que, au contraire des réactions histaminiques directes, les manifestations cutanées, engendrées par la tuberculine, sont progressives et de longue durée, et qu'elles sont entretenues, voire peu à peu amplifiées, par la libération locale de quantités croissantes de substances actives.

D'autre part, le fait même de l'hypersensibilisation a pour conséquence, comme E. Opie (11) l'a démontré à propos du phénomène d'Arthus, de bloquer sur place les protéines d'épreuve introduites sous la peau ou dans la peau. Les nombreuses analogies qui existent entre les réactions anaphylactiques et les réactions allergiques, autorisent à penser qu'il en est de même pour les protéides tuberculiniques injectés dans le derme ou sous la peau des sujets tuberculeux. C'est précisément grâce à ce blocage suivi d'une destruction ou d'une résorption lente que les effets de la tuberculine, dont les premiers et, vraisemblablement, les plus importants consistent dans la libération de substances histaminiques, présentent une allure graduellement inflammatoire ou toxique. C'est aussi à cette rétention plus ou moins durable de la tuberculine et des substances réactionnelles autant qu'à leur concentration dans la zone limitée de l'injection, qu'il faut attribuer, croyons-nous, l'inefficacité des produits antihistaminiques étudiés dans les réponses des cobayes allergiques aux épreuves tuberculiniques.

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la Tuberculose.)

M. G. J. Stefanopoulo : Aux observations de A. Boquet, je pourrais ajouter les résultats également négatifs enregistrés avec le 2339 RP dans les manifestations allergiques locales de la filariose humaine à *F. loa*. Ce produit administré à des doses relativement fortes, dans 3 cas d'œdèmes fugaces typiques, n'a fourni, jusqu'à présent, aucune preuve d'une action curative ou préventive. L'intradermo-réaction pratiquée chez 2 de ces filariens alors qu'ils se trouvaient sous l'influence du médicament n'a pas été influencée dans son évolution. On pourrait expliquer ces résultats par la libération, *in situ*, d'une très grande quantité d'histamine par rapport à la quantité du produit « antagoniste » (terme employé dans la thèse de A. M. Staub, Fac. Sciences, Paris, 1939) apportée par la circulation. Il se peut aussi que le 2339 RP n'agisse pas contre tous les effets de l'histamine.

(10) Nous devons ajouter que les cobayes employés dans ces dernières expériences étaient en assez mauvais état par suite de restrictions alimentaires. Leur sensibilité à la tuberculine était inférieure de plus de moitié à celle que l'on observe habituellement chez les cobayes tuberculeux de cette espèce lorsqu'ils sont convenablement nourris (dose minima réactionnelle de tuberculine : 1/25.000 à 1/50.000 de centimètre cube tout au plus, au lieu de 1/50.000 à 1/100.000 de centimètre cube ou au-dessous).

(11) E. OPIE, *J. exp. Med.*, 1924, 39, 659.

SUR LA PROTÉINE DU VIRUS DE LA MALADIE A POLYÈDRES (GRASSERIE) DU VER A SOIE

par P. DESNUELLE, CHANG CHH TAN et CL. FROMAGEOT.

(Paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.)

SUR LA RAPIDITÉ DE DISPERSION DANS L'ORGANISME DES BACILLES TUBERCULEUX INTRODUITS DANS LA PEAU

par R. LAPORTE.

Pour mesurer la vitesse de dispersion dans l'organisme des bacilles tuberculeux ayant franchi la barrière du revêtement cutané, deux méthodes différentes peuvent être employées. La première consiste à inoculer à des cobayes des fragments d'organes prélevés après des temps variables chez des animaux venant de recevoir une inoculation intradermique de bacilles tuberculeux. La deuxième permet plus de précision dans la mesure du temps minimum mis par les germes virulents pour franchir les limites du foyer d'inoculation ; elle consiste à exciser largement, après des temps également variables, la région cutanée inoculée et à observer si l'infection est, de ce fait, arrêtée ou non. Willis (1), A. Boquet et Valtis (2), ont pu, par cette méthode, fixer à moins d'une heure (Willis) et de dix minutes (Boquet) le temps nécessaire aux bacilles pour se disperser hors de la zone d'infection.

Ce temps limite peut être évalué avec plus de précision encore à la condition toutefois que la dose et la virulence des bacilles soient assez élevées. Si les germes inoculés sont, en effet, trop peu nombreux, ils pourraient être tous arrêtés sur place pour des raisons purement accidentelles. Si, d'autre part, les bacilles qui franchissent les limites du foyer d'inoculation sont peu virulents, l'infection paucibacillaire en résultant pourrait avorter.

Un obstacle important à la réalisation de telles expériences est aussi le danger d'infection de la plaie opératoire par la section des vaisseaux lymphatiques de la peau. Nous avons donc eu recours à une technique qui permet d'éviter totalement cette cause d'erreur : il s'agit de la destruction des tissus par électro- (ou diathermo-) coagulation qui a depuis longtemps fait ses preuves en clinique à ce point de vue, en particulier pour les interventions sur les tumeurs.

(1) WILLIS, *Am. Rev. Tuberc.*, 1925, **41**, 427.

(2) A. BOQUET et VALTIS, *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 68.

Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec le D^r Girau-deau.

Deux lots de chacun 2 cobayes reçoivent en injection intradermique (région du flanc) 1 mg. de bacilles bovins, souche Dup., variante S, en suspension dans 0,1 c. c. d'eau physiologique. Après trente secondes ou cinq minutes, suivant le lot, on procède au niveau de la région inoculée à une électro-coagulation de la peau sur un cercle de 15 mm. de diamètre et en atteignant largement le plan musculaire dans la profondeur. Une intradermo-tuberculation effectuée huit jours après, révèle chez tous les animaux ainsi traités une réaction nettement positive. Dans la suite, les ganglions voisins de la région détruite s'hypertrophient et l'infection tuberculeuse ainsi déclenchée aboutit à la mort de tous les cobayes après un temps variant de huit à quinze semaines. Le traitement par électro-coagulation suffit pour empêcher totalement le développement ultérieur sur place d'une lésion tuberculeuse. Après la chute de la partie nécrosée la cicatrisation s'effectue parfaitement.

Avant de conclure, nous avons recherché si le volume du liquide contenant en suspension les bacilles inoculés n'était pas trop élevé, au point de favoriser leur passage dans la circulation lymphatique pour des raisons purement mécaniques. La quantité de liquide fut alors réduite à 0,01 c. c. contenant la même dose : 1 mg. des mêmes bacilles. Deux cobayes ainsi inoculés subirent le traitement par électro-coagulation trente secondes après l'injection virulente. Le résultat final fut identique : ces 2 animaux devinrent rapidement tuberculeux et moururent onze semaines après l'inoculation.

Grâce à la technique employée, nous avons pu réduire encore le temps entre l'introduction des germes virulents dans la peau et la destruction du foyer d'inoculation. Il suffit pour cela d'utiliser comme électrode coagulante l'aiguille même servant à l'inoculation (1 mg. de bacilles dans 0,01 c. c.). Deux à trois secondes au plus s'écoulèrent ainsi entre les deux temps opératoires. Nous avons complété la destruction par une coagulation large et profonde avec une seconde aiguille stérile. Pour plus de sécurité, on procéda à l'ablation ultérieure, au fer rouge, de l'escarre et des ganglions lymphatiques régionaux. Dans la suite, le cobaye ainsi traité devint aussi rapidement tuberculeux que ceux des expériences précédentes (mort en huit semaines).

Une objection pouvait encore être faite : les bacilles introduits dans la peau ne sont pas tous détruits mais seulement bloqués dans les tissus coagulés ; ils pourraient donc, ultérieurement, infecter la région sous-jacente à l'escarre. Sans doute, une lésion tuberculeuse ne se développe jamais, dans nos expériences, au niveau de la région traitée et cela va à l'encontre de cette hypothèse. Nous avons procédé, néanmoins, dans un autre essai, à l'ablation secondaire, au fer rouge, de l'escarre d'électro-coagulation où des bacilles encore vivants pouvaient être immobilisés. Le résultat ne varia pas ; les 2 animaux ainsi traités moururent de tuberculose.

Enfin, à titre de contrôle, toutes les expériences précédentes furent reproduites sur un nombre égal de cobayes en substituant à l'électro-coagulation la technique classique d'excision large de la peau inoculée : disque de 3 à 4 cm. de diamètre, opération précédée et suivie d'une cautérisation ignée. Toutefois, dans ces essais, l'intervalle entre inoculation et excision ne put être réduit à moins de trente secondes. Les

résultats confirmèrent entièrement ceux qui furent obtenus par électro-coagulation, c'est-à-dire que tous les animaux excisés devinrent tuberculeux.

La conclusion de ces recherches est que le passage dans la circulation lymphatique de bacilles tuberculeux inoculés dans le derme s'effectue avec une extrême rapidité et débute même pendant le temps où s'accomplit l'injection. Ces faits sont à rapprocher de ceux observés chez l'homme par S. Hudack et Mc Master (3) qui utilisèrent des solutions de colorants vitaux dont ils pouvaient suivre la diffusion dans les tissus. Ils virent que la propagation à distance des solutions colorées dans les capillaires et les troncs lymphatiques profonds est très rapide et commence également pendant le temps mis pour injecter ces liquides. Sont aussi à rapprocher certaines expériences entreprises sur un sujet analogue en ce qui concerne la syphilis par Kolle et Elsa Evers qui constatèrent que cinq minutes après l'inoculation dermique de virus syphilitique au cobaye les ganglions correspondants se montrent déjà virulents.

(Institut Pasteur, Laboratoire de recherches sur la Tuberculose.)

CULTURE D'UN VIRUS ET SON INOCULATION SUR FRAGMENTS DE TIGE DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

par G. SEGRETAÏN.

A la suite d'un premier travail sur la culture aseptique de fragments de tige de Tabac (1), nous avons essayé d'associer cette technique à celle des virus des plantes. En effet White est déjà parvenu à multiplier le virus de la mosaïque du Tabac dans des racines isolées de tomates cultivées aseptiquement (2). Nous avons recherché si le même virus pouvait se développer dans les tissus néoformés à partir de cultures de fragments de tige de Tabac mosaïqué et si, d'autre part, on pouvait inoculer des fragments de tige provenant de plantes saines.

Dans des tubes où on introduit 30 c. c. environ d'un milieu de Knop glucosé, gélosé, contenant des substances de croissance, on met en culture, suivant la technique de Gautheret (3), des fragments de cylindre central de tige de Tabac où le cambium est mis à nu. Au bout d'un mois de culture environ, un bourrelet de tissu s'est formé aux dépens de l'assise génératrice, soit à l'une des extrémités du fragment, soit encore au milieu de celui-ci au contact du milieu de culture.

On prélève alors ce tissu néoformé et, après broyage, on en extrait

(3) S. HUDACK et Mc MASTER, *J. exp. Med.*, 1933, **57**, 751.

(1) G. SEGRETAÏN, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 648.

(2) Ph. R. WHITE, *Phytopath.*, 1934, **24**, 1003.

(3) R. J. GAUTHERET, *Manuel technique de culture de tissus végétaux*. Masson, Paris, 1942.

quelques gouttes d'un jus que l'on dilue au 1/10 avec de l'eau distillée. Pour éprouver la virulence de ce jus, on l'inocule aux feuilles d'un pied de *Nicotiana glutinosa*, suivant la technique préconisée par Holmes (4). Sur un pied de cette plante, on conserve 6 feuilles bien

	NOMBRE de lésions locales sur 6 demi-feuilles de <i>Nicotiana glutinosa</i>	POURCENTAGE des lésions par rapport au jus témoin non dilué
<i>Multiplication du virus dans des fragments de tige :</i>		
1° Fragments de tiges de plantes mosaïquées cultivées en serre :		
a) Jus extrait des bourrelets de tissus néo- formés, dilué au 1/10.	13	56,6
Jus témoin non dilué.	23	
b) Jus extrait d'une tige feuillée dilué au 1/10	15	18
Jus témoin non dilué	84	
2° Fragments de tiges de plantes mosaïquées cultivées en pleine terre :		
Jus extrait des bourrelets de tissus néo- formés, dilué au 1/10.	53	39
Jus témoin non dilué.	136	
<i>Expériences d'inoculation du virus :</i>		
1° Jus virulent répandu sur l'assise génératrice :		
Jus extrait des bourrelets de tissus néo- formés, dilué au 1/10.	11	37
Jus témoin non dilué.	30	
2° Jus virulent mis dans le milieu de culture :		
a) Jus extrait des bourrelets de tissus néo- formés, dilué au 1/10	68	44
Jus témoin non dilué.	155	
b) Milieu de culture non dilué contenant V gouttes de jus virulent.	17	
Jus témoin.	275	
<i>Comparaison entre le jus témoin dilué au 1/10 et non dilué.</i>		
Jus témoin dilué au 1/10.	51	45
Jus témoin non dilué.	114	

développées, les autres feuilles et le sommet végétatif sont coupés. Pour inoculer, on frotte légèrement un tampon imbibé de jus, sur la moitié de chacune de ces feuilles ; l'autre moitié est traitée de même avec un jus virulent témoin non dilué. On fait en sorte que dans les deux

(4) F. O. HOLMES, *Bot. Gaz.*, 1929, **87**, 39.

cas les conditions d'inoculation soient aussi semblables que possible. Au bout de quelques jours, on compte les lésions locales apparues sur chaque moitié de feuille.

Dans toutes les expériences, le jus témoin utilisé est un jus de feuilles prélevées sur des *Nicotiana tabacum* P. 19 inoculés depuis trois mois. La souche virulente provenait de cristaux de Stanley dus à l'obligeance de M. Manil. Ce jus a été stérilisé par tyndallisation à basse température, ce qui ne modifie que très peu sa virulence.

Dans une première série d'expériences on a mis en culture des fragments de tiges de *N. tabacum* P. 19 mosaïqués, poussant soit en serre, soit en pleine terre. L'inoculation du jus extrait soit des bourrelets de tissus néoformés, soit de tiges feuillées poussées sur les fragments, a donné des résultats positifs et la virulence de ces jus s'est montrée voisine de celle du jus témoin à la même dilution.

On a alors essayé d'inoculer le jus virulent témoin à des fragments de tiges de tabacs sains mis en culture. On a utilisé deux méthodes. Dans la première, tout de suite après la mise en culture des fragments de tige, on a répandu le jus virulent tyndallisé sur l'assise génératrice mise à nu. Dans une expérience, il y a eu inoculation et la virulence du jus extrait était à peu près égale à celle du jus témoin ; dans une autre expérience, le résultat a été négatif. L'inoculation à *N. glutinosa* de la surface du milieu nutritif gélosé n'a pas donné de lésion. Dans la seconde méthode, on a introduit le jus virulent stérile dans le milieu de culture. Avec des fragments de tige d'un *Nicotiana* sp. et un milieu nutritif renfermant V gouttes de jus virulent par tube, il y a bien eu inoculation et la virulence du jus extrait est voisine de celle du témoin. L'inoculation du milieu de culture non dilué a donné un nombre de lésions bien inférieur. Par contre, deux autres expériences semblables avec des fragments de tiges soit de *Nicotiana* sp., soit de *N. tabacum* P. 19, sur milieu contenant X gouttes de jus virulent par tube ont été négatives, alors que le milieu de culture s'est montré encore virulent.

En résumé, le virus de la mosaïque ordinaire du Tabac semble bien proliférer dans les tissus néoformés à partir de fragments de tige de Tabac et il est possible d'inoculer ce virus à des fragments de tige de plantes saines mis en culture. Cette méthode d'inoculation pourrait être particulièrement intéressante, appliquée à certains virus transmissibles seulement par les insectes chez lesquels on admet que le rostre atteint le cambium de la plante (5).

(Institut Pasteur. Laboratoire de Phytopathologie.)

(5) F. C. BAWDEN, *Plant viruses and virus diseases*. Chronica Botanica Company. Leiden, Holland, 1939, 67.

